



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES GENS FÜR EINE
TRIMETHOPRIM-RESISTENTE DIHYDROFOLATREDUKTASE AUS DEM
R-FAKTOR R388

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Johannes Werner Zolg
aus Worms-Abenheim

München 1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

2. Berichterstatter: Dr. G. Korge

Sondervotum: Prof. Dr. H. G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 1978



Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Oktober 1973 bis Februar 1978 durchgeführt.

Herrn Prof.Dr. H.G.Zachau danke ich für die Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. U.J.Hänggi danke ich herzlich für die Anregungen und Diskussionen, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Bei den Kollegen der Abteilung möchte ich mich für Nukleinsäure- und Nukleasepräparationen, sowie für zahlreiche Diskussionen bedanken. Mein besonderer Dank gilt dem Cusanuswerk, Bischöfliche Studienförderung, Bonn-Bad Godesberg, für das Promotionsstipendium von 1973 - 1976.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

J.W. Zolg und U.J. Hänggi, Z.physiol.Chem. 358, 1306 (1977)

J.W. Zolg, U.J. Hänggi und H.G. Zachau, Molec.Gen.Genet., im Druck (1978)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	5
2.1. Isolierung von Plasmid-DNA	5
2.1.1. Isolierung von R388 aus <u>E.coli</u>	7
2.1.2. Isolierung von R388 aus <u>P.mirabilis</u>	10
2.1.3. Vergleich von R388 aus <u>E.coli</u> und R388 aus <u>P.mirabilis</u>	12
2.2. Identifizierung und Charakterisierung des Trimethoprim-Resistenzgens durch Restriktionsnukleasen	14
2.2.1. Spaltung von R388 ⁺ -DNA mit der Restriktionsnuklease EcoRII und Isolierung von pWZ11	15
2.2.1. Einbau von pWZ11 in pSF2124	19
2.2.3. Physikalische Karte von pWZ61	21
2.2.4. Lokalisierung des Trimethoprim-Resistenzgens durch Konstruktion der Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94	45
2.2.5. Versuche zur Zirkularisierung des BamHI-Fragmentes von 7 840 bp	47
2.2.6. Einbau des Dimeren in pSF2124	51
2.2.7. Einbau des isolierten 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragmentes in pBR322	55

	Seite
2.2.8. Kartierung des isolierten Restriktions- fragmentes mit 6 Restriktionsnukleasen	56
2.2.9. <u>in vivo</u> Deletion eines Teils des 1 770 bp- Fragmentes (pWZ703)	59
2.2.10. Schematische Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und der Versuche, die zur Identifizierung des Dihydrofolatre- duktase-Gens führten	65
2.3. Liegt das Strukturgen für eine Trimethoprim- resistente Dihydrofolatreduktase auf dem Plasmid R388?	68
2.3.1. Isolierung von Mutanten mit einer tempera- tursensitiven, Trimethoprim-resistenten Di- hydrofolatreduktase	69
2.3.2. Versuche zum Nachweis der Dihydrofolatreduk- tase in einem DNA-abhängigen <u>in vitro</u> Pro- teinsynthese-System	71
2.3.3. <u>in vivo</u> Expression der Plasmid-codierten Di- hydrofolatreduktase in isolierten Minizellen	72
2.3.4. Vergleich der Menge an Dihydrofolatreduktase von <u>E.coli</u> (R388) und <u>E.coli</u> (pWZ820) und der Zahl der Plasmidkopien pro Zelle	75
2.4. Charakterisierung der Plasmid-codierten Di- hydrofolatreduktase und Vergleich mit dem <u>E.coli</u> -Enzym	80
2.4.1. Hemmung der Enzyme durch Trimethoprim und Methotrexat	81
2.4.2. Messung der Dihydrofolatreduktase-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen und in Gegen- wart von SDS und Harnstoff	81
3. Diskussion	84
3.1. Isolierung und Charakterisierung von R388-DNA	84

	Seite
3.2. Deletion von R388-DNA	86
3.3. Zuordnung von Funktionen zu bestimmten Restriktionsfragmenten von pWZ61	86
3.4. Lokalisierung des Trimethoprim-Resistenzgens	90
3.5. Nachweis des Strukturgens der Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase auf dem 1 770 bp-Fragment	91
3.6. Die Regulation des Dihydrofolatreduktase-Gens des R-Faktors R388	93
3.7. Ausblick	95
4. Materialien und Methoden	97
4.1. Reagenzien	97
4.2. Medien	97
4.3. Bakterienstämme und Plasmide	97
4.4. Desoxyribonukleinsäuren	98
4.4.1. Präparative Isolierung von R388- und R388 ⁺ -DNA	98
4.4.2. Präparative Isolierung der DNA von ColE1-Derivaten	99
4.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Einzelkolonien	100
4.4.4. Markierung von DNA mit [³ H]Thymidin	100
4.4.5. Bestimmung der DNA-Konzentration	101
4.5. Transfer von R388	101

	Seite
4.6.	Transformation und Selektion der Transformanten 101
4.7.	Mutagenese von <u>E.coli</u> (R388) 102
4.8.	Restriktionsnukleasen 102
4.8.1.	Isolierung von zwei Restriktionsnukleasen aus <u>Haemophilus parainfluenzae</u> 102
4.8.2.	Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen 104
4.9.	Gelelektrophorese 105
4.9.1.	Analytische Trennung von Restriktionsfragmenten 105
4.9.2.	Präparative Isolierung von Restriktionsfragmenten 106
4.9.3.	Bestimmung der Fragmentlängen 106
4.10.	Ligierung der DNA 106
4.11.	<u>in vitro</u> Konstruktion der Plasmide 107
4.12.	Anreicherung der Plasmid-codierten Dihydrofolat- reduktase 108
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse 109
6.	Literaturverzeichnis . 113
7.	Abkürzungsverzeichnis 119
	Lebenslauf

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Das Enzym Dihydrofolatreduktase (EC 1.5.1.3.) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat. Es ist ein Schlüsselenzym im Folat-Stoffwechsel (1). Die Hemmung der Dihydrofolatreduktase durch Antagonisten (Antifolate) führt zu einer Erniedrigung der Tetrahydrofolat-C1-Coenzym Spiegel. Dies bedeutet einen zentralen Eingriff in die DNA-, RNA- und Aminosäuresynthese und führt zum Zelltod. Der Wirts-spezifischen Hemmung des Enzyms kommt im klinischen Bereich große Bedeutung zu. So wird Trimethoprim zur Bekämpfung bakterieller Infektionen eingesetzt. Die antibakterielle Wirkung des Trimethoprims beruht auf der hohen Affinität des Hemmstoffes zu der bakteriellen Dihydrofolatreduktase; Trimethoprim hemmt die Dihydrofolatreduktase höherer Zellen nicht oder nur in geringem Umfang (2,3). Pyrimethamin hemmt die Dihydrofolatreduktase von Plasmodien und wird zur Therapie von Malaria eingesetzt (4). Ein weiterer wichtiger Inhibitor der Dihydrofolatreduktase ist Methotrexat, das das Wachstum schnell wachsender Tumore (Leukämie) stärker hemmt als das Wachstum nicht maligner Zellen (5).

Wegen der klinischen Bedeutung der Antifolate sind die Protein-chemischen Aspekte der Dihydrofolatreduktase gut untersucht (6,

7,8). Im Gegensatz dazu ist die Regulation der Synthese des Enzyms nur teilweise oder nicht bekannt, obwohl eine der Ursachen für die Resistenz gegen Antifolate auf einem geänderten Regulationsmechanismus der Synthese des Enzyms beruht. Die Folge dieser geänderten Regulation ist eine Überproduktion der Dihydrofolatreduktase, wie sie bei Mutanten des Bakteriophagen T4 (9), von E.coli (10) und von Säugetierzellen (11) beobachtet wurde.

In den letzten Jahren sind Techniken entwickelt worden, durch die DNA-Fragmente mit spezifischen Genen und den dazu gehörenden Regulationssequenzen identifiziert, isoliert und amplifiziert werden können (Übersicht Ref. 12,13,14,15). Diese Techniken umfassen mehrere Teilschritte:

1. Isolierte DNA wird mit bakteriellen Endonukleasen (Restriktionsnukleasen) gespalten. Diese Enzyme erkennen spezifische Nukleotidsequenzen der DNA und spalten sie an diesen Stellen, sodaß sequenzeinheitliche Fragmente entstehen, die mit biochemischen Methoden aufgetrennt und isoliert werden können. Von den bekannten Restriktionsnukleasen sind jene zur Neukombination von genetischem Material besonders gut geeignet, die DNA unter Ausbildung kohäsiver Einzelstrangenden spalten.

2. Die so entstandenen Restriktionsfragmente lassen sich mit einem Vektor, der zuvor in der gleichen Weise gespalten wurde, durch das Enzym Ligase verknüpfen. Als Vektoren können Plasmide, Bakterio-

phagen oder Viren verwendet werden.

3. Mit der neukombinierten DNA werden kompetente Empfängerzellen transformiert. Die Transformanten, die neu verknüpfte DNA enthalten, können unter geeigneten Selektionsbedingungen von den Zellen, die keine DNA aufgenommen haben, unterschieden und abgetrennt werden.

4. Die Gesamt-DNA der Transformanten wird isoliert, die neu verknüpfte DNA von der Wirts-DNA abgetrennt und mit biochemischen Methoden charakterisiert.

Die Anwendung der beschriebenen Techniken zur Neukombination von genetischem Material ist möglicherweise ein Weg, ein DNA-Fragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen des R-Faktors R388 zu identifizieren und zu isolieren. Mit diesem isolierten Fragment sollte die Regulation der Genexpression untersucht werden. Der R-Faktor R388 induziert in den Zellen die Bildung einer zusätzlichen Dihydrofolatreduktase, die 10 000 mal resistenter gegen Trimethoprim ist als das Wirts-Enzym (16). Bakterien, die den R-Faktor R388 enthalten, sind in der Lage, in Gegenwart von Trimethoprim, einem spezifischen Inhibitor der bakteriellen Dihydrofolatreduktase, zu wachsen. Der R-Faktor R388 wurde unter anderem deswegen als Modell zur Untersuchung der Regulation für die Expression des Dihydrofolatreduktase-Gens gewählt, weil die R388-Sequenzen, die für die Plasmid-induzierte Dihydrofolatreduktase codieren,

nach Insertion in vitro in andere Vektoren durch die in vivo Expression der Trimethoprim-Resistenz leicht identifiziert werden können.

Ein weiterer Vorteil des R-Faktors R388 als Modell-System ist die geringe Größe seiner DNA (Molekulargewicht $21,5 \times 10^6$, Ref. 17) im Vergleich zu dem Chromosom von E.coli (Molekulargewicht $2,5 \times 10^9$) oder eukaryontischen Zellen (Molekulargewicht ca. 3×10^{12}). Neben dem gesuchten Trimethoprim-Resistenzgen liegen auf der R388-DNA noch die Gene für die Resistenz gegen Sulfonamide und die Fähigkeit, sich selbst zu übertragen (18). Die Gene für diese Eigenschaften können deletiert werden und damit kann der R-Faktor R388 weiter verkleinert werden.

Es war die Aufgabe, aus dem R-Faktor R388 ein DNA-Fragment zu isolieren, das außer dem Strukturgen für die Synthese der Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase noch die Regulationselemente für die Expression des Gens enthält. Dieses Fragment sollte mit den Methoden der Nukleinsäure-Biochemie charakterisiert werden. Die Genexpression und die Eigenschaften des gebildeten Enzyms waren zu untersuchen.

2. ERGEBNISSE

2.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Reinigung von Plasmid-DNA werden zunächst die Bakterienzellen durch Lysozym in Sphäroblasten umgewandelt, die dann durch Detergentien vollständig lysiert werden. Eine Anreicherung der Plasmid-DNA erfolgt durch eine niedertourige Zentrifugation, wie sie zuerst für die Isolierung von Polyoma-DNA beschrieben wurde (19). Dabei sedimentieren die partikulären Zellbestandteile und die Hauptmenge der Wirts-DNA, während die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt (klares Lysat). Plasmid-DNA mit einem Molekulargewicht von $1,5-150 \times 10^6$ lässt sich von der Wirts-DNA (Molekulargewicht ungefähr $2,5 \times 10^9$) mit zwei Methoden abtrennen: Eine Methode basiert auf der unterschiedlichen Konformation der Plasmid-DNA (superhelikale Konformation) gegenüber der Wirts-DNA (lineare DNA). Die andere macht sich den unterschiedlichen G+C-Gehalt von E.coli-Plasmiden und Proteus-DNA zunutze (Übersicht, Ref.20). Je nach Konformation der DNA lagern sich Acridinfarbstoffe (z.B. Äthidiumbromid) in unterschiedlichen Mengen an die DNA an, wodurch sich ihre Schwimmdichte ändert. Plasmid-DNA in der superhelikalen Konformation bindet weniger Äthidiumbromid als die lineare Wirts-DNA. Dies

ermöglicht in CsCl-Äthidumbromid-Gradienten eine Abtrennung der Plasmid-DNA ($\rho = 1,60$ g/ml) von der Bakterien-DNA ($\rho = 1,56$ g/ml für E.coli). Ein Nachteil dieser Trennmethode besteht darin, daß nur die superhelikale Konformation der Plasmid-DNA erfaßt wird. Die im Verlauf der Isolierung linearisierte Plasmid-DNA bindet gleich viel Äthidumbromid wie die Bakterien-DNA, bandet somit an der gleichen Stelle im Gradienten wie die Wirts-DNA und kann deshalb nicht isoliert werden.

Während Plasmide in E.coli mit einem G+C-Gehalt von 45-55% eine Schwimmdichte von 1,704-1,718 g/ml besitzen, bandet E.coli-DNA mit einem G+C-Gehalt von 50% bei 1,710 g/ml in CsCl. Diese geringen Dichteunterschiede von Plasmid- und Wirts-DNA ermöglichen zwar eine Anreicherung aber keine Abtrennung der Plasmid-DNA in CsCl-Dichtegradienten. Die Abtrennung wird erst möglich, wenn E.coli-Plasmide in Bakterien der Gattung Proteus, die sich durch einen G+C-Gehalt von 38-39% auszeichnen, übertragen werden. Proteus-DNA hat eine Schwimmdichte von 1,699 g/ml in CsCl. Dieser Dichteunterschied zwischen der DNA von E.coli-Plasmiden und der DNA von Proteus reicht aus, Plasmid-DNA von der Wirts-DNA in CsCl-Gradienten ohne den Zusatz von Äthidumbromid abzutrennen.

Beide Trennverfahren, CsCl-Äthidumbromid-Gradienten und Transfer der Plasmide in P.mirabilis und Abtrennung der Plasmid-DNA aufgrund des G+C-Gehaltes, wurden angewendet, um den R-Faktor R388 zu isolieren.

2.1.1. Isolierung von R388 aus E.coli

Bei den ersten analytischen Versuchen den R-Faktor R388 aus E.coli zu isolieren, wurden die Sphäroblasten mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsarcosinat (Sarcosyl) aufgebrochen (21). Die Plasmid-DNA wurde durch anschließende CsCl-Äthidiumbromid-Dichtezentrifugation weiter gereinigt. Dabei zeigte sich, daß nur ein sehr kleiner Teil der DNA in der superhelikalen Konformation vorlag. Die Menge an Plasmid-DNA, die aus den Gradienten isoliert werden konnte, reichte nicht aus, um sie mit Restriktionsnukleasen näher zu charakterisieren.

Um die Lysebedingungen zu optimieren und um damit die Ausbeute an R388-DNA zu steigern, wurde die DNA von E.coli (R388) mit [^3H]Thymidin markiert und die Zellen mit verschiedenen Detergentien aufgebrochen. Die Sarcosylkonzentration wurde verdoppelt (2% w/v, Ref.21), die Sphäroblasten mit Triton X100 (22) oder SDS (23) oder mit einer Mischung aus Brij-58 mit Natriumdesoxycholat (24) lysiert. Mit allen benutzten Detergentien konnten 5-8% der [^3H]-markierten DNA aufgrund ihrer Schwimmdichte in CsCl-Äthidiumbromid-Gradienten als Plasmid-DNA identifiziert werden. Da große Mengen an Plasmid-DNA benötigt wurden, war es notwendig, die Zellen statt in 30 ml Kulturen in 10-30 l Kulturen anzuziehen. Um eine bessere Abtrennung der Plasmid-DNA von der Wirts-DNA in den CsCl-Äthidiumbromid-Gradienten zu erreichen,

wurden die klaren Lysate mit Proteinase K behandelt und die RNA mit einer Hydroxyapatit-Säule entfernt. Dabei zeigte sich, daß in diesem präparativen Maßstab weder mit Sarcosyl (21), noch mit Brij-58 (24), noch mit SDS (23) ausreichende Mengen R388-DNA in der superhelikalen Konformation isoliert werden konnten. Versuche, große Mengen Plasmid-DNA im klaren Lysat durch Zentrifugation auf ein Kissen mit CsCl zu konzentrieren (22), brachten ebenso keine Steigerung der Plasmid-Ausbeute wie der Versuch, die Plasmid-DNA durch Polyäthylenglycol selektiv auszufällen (25). Eine Steigerung der Ausbeute an R388-DNA in der superhelikalen Konformation konnte auch dadurch nicht erzielt werden, daß die Zellen in Minimalmedium anstelle des sonst benutzten L-Mediums angezogen, oder in der logarithmischen Wachstumsphase, anstelle der stationären Phase, geerntet wurden.

Da R388-DNA in der superhelikalen Konformation mit Hilfe der beschriebenen Methoden nicht in ausreichender Menge isoliert werden konnte, wurde versucht, sie in CsCl-Dichtegradienten ohne den Zusatz von Äthidumbromid von der E.coli-DNA abzutrennen. Versuche in der analytischen Ultrazentrifuge zeigten, daß die Trennung von R388-DNA und E.coli-DNA möglich ist. Die Plasmid-DNA erschien als Schulter mit einer Schwimmdichte von 1,716 g/ml auf der schweren Seite der E.coli-DNA ($\rho = 1,710$ g/ml) (Abb.1A).

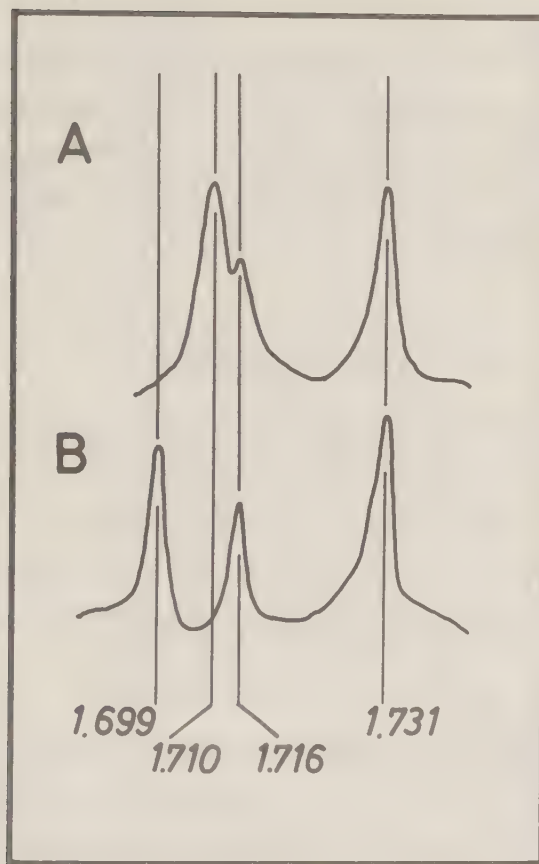


Abb.1 Densitogramme eines analytischen CsCl-Dichte-Gradientenlaufes von A: E.coli 114 (R388) und B: P.mirabilis (R388)

Die dialysierten Spitzenfraktionen der Hydroxyapatitsäule (4.4.1.) ($3\text{ }\mu\text{g}$ DNA in $90\text{ }\mu\text{l}$) wurden mit $10\text{ }\mu\text{l}$ M.lysodeicticus-DNA (1A_{260} -Einheit/ml; Dichte= $1,731\text{ g/ml}$) und $900\text{ }\mu\text{l}$ einer CsCl-Lösung ($12,05\text{ g CsCl}$, suprapur, E.Merck, Darmstadt, plus $7,96\text{ ml}$ 10 mM Tris-HCl, pH $8,4$) gemischt. Die Lösung mit einer Ausgangsdichte von $1,7013\text{ g/ml}$ wurde für 18 Std. bei $40\text{ }000\text{ Upm}$ und 20°C in der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, Modell E, Rotor AnF) zentrifugiert und die Proben bei 260 nm densitometriert.

Es zeigte sich, daß zwar der Unterschied in der Schwimmdichte von 6 mg/ml auch in präparativen Gradienten für eine Anreicherung der Plasmid-DNA ausreichte, die gewünschte völlige Abtrennung von der Wirts-DNA trotz Rezentrifugation nicht möglich war (Abb.2; linker Bildteil).

2.1.2. Isolierung von R388-DNA aus *P.mirabilis*

Nach Transfer von R388 aus *E.coli* 114 in *P.mirabilis* vergrößerte sich der Unterschied in der Schwimmdichte zwischen Plasmid- und *Proteus*-DNA auf 17 mg/ml. Dieser Unterschied ermöglicht eine Abtrennung der Plasmid-DNA nicht nur in analytischen (Abb.1 B), sondern auch in präparativen CsCl-Dichtegradienten (Abb.2, Bildmitte).

Durch CsCl-Zentrifugation in Anwesenheit von Actinomycin D konnte der Schwimmdichteunterschied zwischen *Proteus*-DNA und R388-DNA auf 40 mg/ml vergrößert werden (Abb.2 rechter Bildteil). Mit Hilfe dieser Gradienten konnte R388-DNA, frei von *Proteus*-DNA, isoliert werden. Die Trennschärfe der Gradienten war davon abhängig, daß Actinomycin D in der Kälte (0-3°C) zur DNA-haltigen CsCl-Lösung zugegeben und die anschließende Zentrifugation bei 3°C ausgeführt wurde (26). Die beste Trennung wurde bei einer Anfangsdichte von 1,58 g/ml und 20 µg Actinomycin D/ml erzielt. Bemerkenswert war, daß in diesen CsCl-Actinomycin-Gradienten die

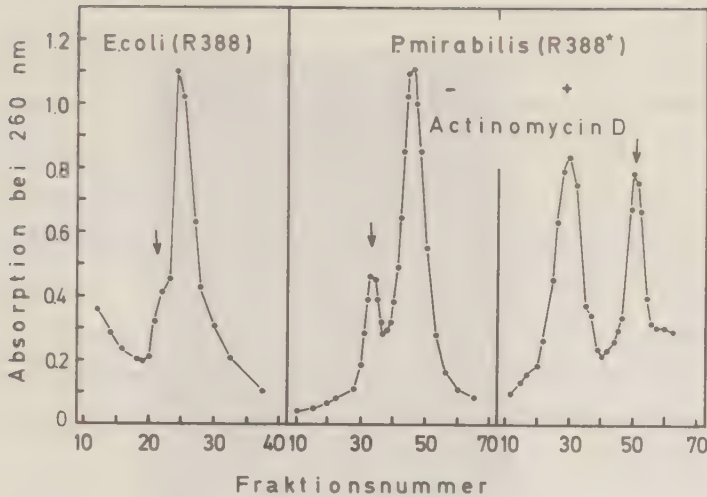


Abb.2 Trennung von Plasmid- und Wirts-DNA in präparativen CsCl-Dichtegradienten

linker Bildteil: DNA von *E. coli* 114 (R388);
 Bildmitte: DNA von *P. mirabilis* (R388*)
 ohne Actomycin D;
 rechter Bildteil: DNA von *P. mirabilis* (R388*)
 in Gegenwart von 20 µg Acto-
 mycin D/ml;

Die DNA wurde über Hydroxyapaptit gereinigt und in CsCl zentrifugiert (4.4.1.). Die Plasmid-haltigen Fraktionen der ersten CsCl-Zentrifugation wurden vereinigt und unter den gleichen Bedingungen rezentrifugiert. Die Verteilung der DNA nach der zweiten Zentrifugation ist wiedergegeben. Die Pfeile geben die Position der Plasmid-DNA an. Die Dichte in den Gradienten nimmt von links nach rechts zu.

Plasmid-DNA auf der leichten Seite der Wirts-DNA bandete und es deshalb vorteilhaft war, die Gradienten nicht nach unten auszutropfen (vgl. Abb.2, linker Bildteil und Bildmitte), sondern von unten nach oben auszupumpen (Abb.2, rechter Bildteil). Die Plasmid-DNA war im durchscheinenden Licht als blaßgelbe Bande zu sehen. Mit diesem Verfahren konnten aus einer 10 l Kultur von P.mirabilis (R388) 150 µg reine Plasmid-DNA isoliert werden. Unter der Berücksichtigung des Molekulargewichtes von R388 von $21,5 \times 10^6$ (17) ergibt sich eine Ausbeute von ungefähr 0,3 Kopien pro Zelle.

2.1.3. Vergleich von R388 aus E.coli mit R388 aus P.mirabilis

E.coli 114 (R388) und P.mirabilis (R388) waren beide gegen 1 mg Trimethoprim/ml und 500 µg Sulfathiazol/ml resistent. Diese Antibiotikakonzentrationen hemmen das Wachstum Plasmid-freier Stämme völlig. Ebenso zeigte sich nach analytischer Ultrazentrifugation, daß die Menge an R388-DNA in E.coli und in P.mirabilis ungefähr gleich war. Hingegen wurden Unterschiede deutlich, wenn R388-DNA aus E.coli und aus P.mirabilis mit der Restriktionsnuklease HindII gespalten wurde und die Spaltmuster nach Trennung der DNA auf Agarosegelen miteinander verglichen wurden (Abb.3). Mit R388-DNA aus E.coli wurden 13 Fragmente erhalten (Abb.3b). Zwei Fragmente mit einer Länge von 970 bp und 875 bp fehlten in dem HindII-Muster von R388-DNA aus P.mirabilis (Abb.3c). Stattdessen tauch-

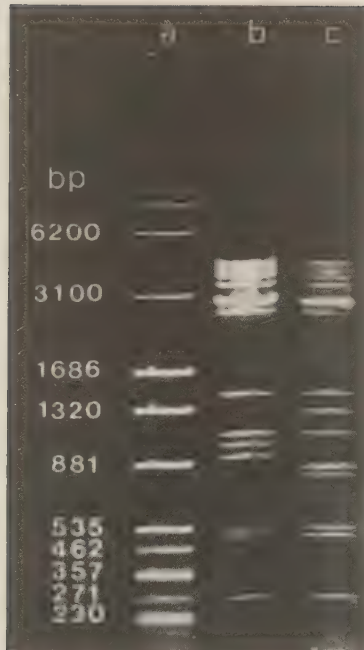


Abb.3: Vergleich der HindII-Fragmente von R388 aus E.coli (b) mit R388 aus P. mirabilis (c)

Die Fragmente wurden auf einem 0,85% Agarose-Plattengel für 3 Std. bei 5 V/cm aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde in (a) λ dv21-Octamer -DNA (mit EcoRI partiell gespalten) und λ dv1-DNA (mit Bsu gespalten) aufgetragen.

ten drei neue Fragmente von 1 300 bp, 850 bp und 780 bp Länge auf. Die Gesamtlänge von R388 vergrößerte sich durch den Transfer von E.coli in P.mirabilis um ungefähr 1 000 bp. Aufgrund dieser Ver-

größerung wurde R388 in P.mirabilis als R388⁺ bezeichnet.

2.2. Identifizierung und Charakterisierung des Trimethoprim-Resistenzgens durch Restriktionsnukleasen

Die DNA des R-Faktors R388⁺ hat ein Molekulargewicht von $21,5 \times 10^6$ (17), was ungefähr 32 000 Basenpaaren entspricht. Diese DNA-Länge reicht aus, um für etwa 30 Gene zu codieren. Sechs Eigenschaften von R388 sind bekannt:

1. die Resistenz gegen Trimethoprim (Tp);
2. die Fähigkeit, sich selbst zu vermehren;
3. die Fähigkeit, sich selbst zu übertragen (Tra⁺);
4. Resistenz gegen Sulfonamide (Su);
5. Incompatibilität gegen Plasmide der W-Gruppe;
6. Ausbildung von Pili der W-Gruppe;

Mit dem Ziel, die DNA-Sequenzen zu isolieren, die für die Plasmid-induzierte, Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase codieren, können die Gene von R388, die für die Eigenschaften 2-6 codieren, deletiert werden. Zunächst sollte ein lebensfähiges, Trimethoprim-resistentes Plasmid isoliert werden (Eigenschaften 1-2), um in einem zweiten Deletionsschritt das Trimethoprim-Resistenzgen weiter einzuengen (Verlust von Eigenschaft 2). Ein Beispiel für lebensfähige Plasmide, die durch Deletionen ent-

standen sind, sind die λ dv-Plasmide (Ref.27). Durch UV-Induktion von lysogenen λ -Phagen und in vivo Zirkularisation der ausgeschnittenen λ -DNA-Fragmente wurden λ -Derivate erhalten, die nur noch 5% der λ -DNA enthielten (λ dv93). Diese Methode der Plasmid-Verkleinerung ist relativ unspezifisch und sollte, im Falle des R-Faktors R388, durch Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen und in vitro Verknüpfung der entstehenden Fragmente mit Ligase ersetzt werden.

2.2.1 Spaltung von R388*-DNA mit der Restriktionsnuklease EcoRII und Isolierung von pWZ11

Zur Zeit der Versuche standen die Restriktionsnukleasen EcoRI, EcoRII, HindIII, HpaII, HindII, HpaI und Bsu zur Verfügung. Nur die vier erstgenannten spalten DNA-Doppelstränge so, daß kohäsive Einzelstrangenden (sticky ends) entstehen. R388*-DNA wird von EcoRI und HindIII nur einmal gespalten. Mit HpaII entsteht eine Vielzahl sehr kleiner Fragmente, sodaß die Wahrscheinlichkeit groß ist, daß mit dieser Restriktionsnuklease das Trimethoprim-Resistenzgen von R388 gespalten und damit inaktiviert wird. R388*-DNA wird von EcoRII in etwa 30 Fragmente gespalten (Abb.4A). Ein Endmuster wurde mit dieser Restriktionsnuklease weder durch Erhöhung der Enzymkonzentration noch durch Verlängerung der Inkubationszeit erhalten. Die beabsichtigte Deletion von R388-DNA (2.2.) wird durch Ligierung von Partialfragmenten

begünstigt. Sollte das Trimethoprim-Resistenzgen Erkennungssequenzen für EcoRII enthalten, besteht nach Partialsplaltung die Möglichkeit, daß auf einigen DNA-Partialfragmenten das Trimethoprim-Resistenzgen ungeschädigt vorhanden ist. Damit bleibt die Möglichkeit bestehen, Trimethoprim-resistente R388-Deletionsplasmide isolieren zu können.



Abb.4: Partialsplaltung von R388*-DNA mit der Restriktionsnuklease EcoRII (A)

Die Fragmente wurden auf 1,3% Agarose-Rundgelen (0,7x20 cm) in Tris-Borat-Puffer für 4 Std. bei 4 V/cm aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde in (B) Maus-Satelliten-DNA (mit EcoRII gespalten) aufgetragen. Die Länge des Monomers beträgt 240 ± 2 bp.

Nach Transformation von P.mirabilis mit einem in vitro ligierten Gemisch von EcoRII-Partialfragmenten von R388⁺-DNA und Selektion auf Trimethoprim-Resistenz wurden 39 Transformanten dieses Phänotyps weiter untersucht. Geprüft wurde die Fähigkeit sich selbst zu übertragen und in Gegenwart von Sulfonamiden zu wachsen (Tabelle 1)

Tabelle 1: Kopplung der Marker für Sulfonamid-Resistenz (Su) und der Fähigkeit sich selbst zu übertragen (Tra) von 39 Trimethoprim-resistenten Deletionsplasmiden des R-Faktors R388⁺

Den Agar-Platten war 500 µg Sulfathiazol/ml zugesetzt; der Transfer erfolgte in E.coli JC7623 als Rezipient.

	Su	Su ⁻
Tra	7	1
Tra ⁻	10	21

Die Plasmid-DNA der 21 Transformanten des Phänotyps Tp,Su⁻, Tra⁻ wurde isoliert und ihre Größe auf Agarosegelen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß diese Plasmide heterogen in ihrer Größe waren. Das kleinste, sich autonom replizierende Plasmid (pWZ11) wurde aus dem Gel isoliert. Mit dieser DNA wurde P.mirabilis erneut transformiert und so das Plasmid vermehrt. Nach Isolierung der DNA zeigte sich, daß pWZ11 nur noch eine Länge von 7 100 bp besaß. Dies entspricht noch 22% der Länge des Ausgangsplasmids R388⁺.

Mit der Verkleinerung des Plasmids auf $1/4$ der Ausgangsgröße sank auch die DNA-Ausbeute auf $1/4$ der Mengen, die mit R388* erhalten wurden. Dies läßt darauf schließen, daß die Zahl der Plasmidkopien/Zelle von pWZ11 und R388* gleich geblieben ist. Aus 10 l Kulturen von P.mirabilis (pWZ11) ließen sich über CsCl-Actinomycin D-Dichtegradienten 50 µg reine Plasmid-DNA isolieren, was ungefähr 0,3 Kopien/Zelle entspricht.

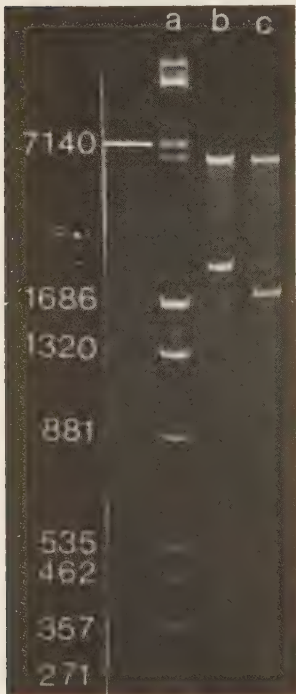


Abb.5: Spaltung von pWZ11-DNA mit BamHI (b) und BamHI + EcoRI (c)

Zum Größenvergleich wurde in (a) λ dv1-DNA (mit Bsu gespalten) und PM2-DNA (linearisiert mit HindIII) aufgetragen. Die Trennung der Fragmente erfolgte auf einem 2% Agarose-Plattengel (29x14x0,25 cm) für 7 Std. bei 3 V/cm.

pWZ11 wird von der Restriktionsnuklease BamH1 zweimal (Abb.5b), von EcoRI einmal gespalten. Nach Spaltung von pWZ11-DNA mit EcoRII, Bsu und HpaII entstehen zahlreiche Bruchstücke. Die Länge der BamH1-Fragmente beträgt 5 030 bp und 2 080 bp. Das kleinere Fragment wird von EcoRI in zwei Fragmente von 1 770 bp und 310 bp gespalten (Abb.5c).

2.2.2 Einbau von pWZ11 in pSF2124

pWZ11 liegt wie der R-Faktor 388 nur in wenigen Kopien pro Zelle vor (stringent control), was die geringe Ausbeute an Plasmid-DNA erklärt (2.2.1.). Es ist möglich, die Ausbeute an pWZ11-DNA zu steigern, indem man pWZ11 in ein Plasmid einbaut, das in vielen Kopien pro Zelle vorliegt (relaxed control). Zum Zeitpunkt der Versuche erschien es am geeignetsten, pWZ11 in das Plasmid pSF2124 einzubauen. pSF2124 ist aus dem ColE1-Faktor (Molekulargewicht: $4,2 \times 10^6$) und dem Transposon Tn3 (Molekulargewicht: $3,2 \times 10^6$) zusammengesetzt (28). pSF2124 hat je eine Erkennungssequenz für die Restriktionsnukleasen EcoRI und BamH1. Die Spaltstelle für EcoRI liegt in dem Gen für die ColicinE1-Synthese (29), 18% vom Replikationsstartpunkt entfernt (30). Die BamH1-Spaltstelle liegt im Tn3-Teil außerhalb des Ampicillin-Resistenzgens. Wenn fremde DNA in die EcoRI-Spaltstelle von pSF2124 integriert wird, geht damit die Fähigkeit, ColicinE1 zu produzieren verloren ($Ce1^-$), ohne daß die Immunität gegen ColicinE1 ($Ice1$) oder die

Ampicillin-Resistenz (Ap) verändert wird.

pWZ11-DNA und pSF2124-DNA wurden mit EcoRI gespalten und mit Ligase in vitro verknüpft. Mit dem DNA-Gemisch wurde E.coli C transformiert und die Transformanten auf Tp, Ap, Icc1 und Ce1⁻ selektioniert. Alle 15 untersuchten Transformanten enthielten ein Plasmid (pWZ61), das aus pWZ11 und pSF2124 zusammengesetzt war (Abb.6).

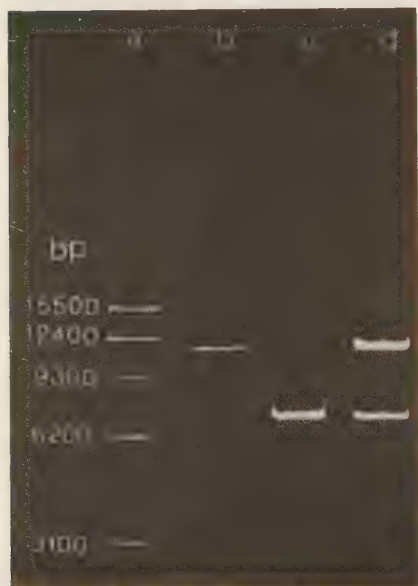


Abb.6: EcoRI-Spaltung von pSF2124 (b), pWZ11 (c) und des hybriden Plasmids pWZ61 (d)

Zum Größenvergleich wurde in (a) λ dv21-Octamer-DNA (partiell mit EcoRI gespalten) aufgetragen. Die Trennung der Fragmente erfolgte auf einem 0,5% Agarose-Plattengel für 4,5 Std. bei 3,5 V/cm.

pWZ61 ließ sich wie der ColE1-Faktor (31) und pSF2124 (28) in Gegenwart von Chloramphenicol amplifizieren. Aus einer 1 l Kultur von pWZ61 konnte 1 mg reiner Plasmid-DNA isoliert werden, was 200 Kopien/Zelle entspricht. Durch den Einbau von pWZ11 in pSF2124 standen nun ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zur Verfügung, um Strukturuntersuchungen mit Hilfe von Restriktionsnukleasen durchführen zu können.

2.2.3. Physikalische Karte von pWZ61

Physikalische Karten (Restriktionskarten), auf denen die Anzahl und der Abstand der Spaltstellen für verschiedene Restriktionsnukleasen angegeben sind, können wichtige Aufschlüsse über den Aufbau des Genoms geben. Die bei der Spaltung entstehenden Restriktionsfragmente können isoliert und daraufhin untersucht werden, ob sie für bestimmte Funktionen codieren. Damit wird eine Korrelation zwischen genetischer Karte und physikalischer Karte möglich.

Bei der Erstellung einer physikalischen Karte spaltet man die DNA mit einer Restriktionsnuklease und bestimmt elektrophoretisch die Anzahl und die Größe der entstehenden Fragmente. Die Reihenfolge der Fragmente ermittelt man durch Spaltung der DNA unter Bedingungen, bei denen die Enzymmenge oder die Inkubationszeit limitierend sind (Partialspaltung). Die entstehenden Partial-

fragmente setzen sich aus zwei oder mehreren Endfragmenten zusammen. Durch den Vergleich verschiedener, einander überlappender Partialfragmente läßt sich die Reihenfolge der Endfragmente festlegen.

Um die Spaltstellen für eine zweite Restriktionsnuklease zu bestimmen, spaltet man die DNA mit zwei Restriktionsnukleasen in zwei getrennten Ansätzen und in einem dritten Ansatz mit beiden Nukleasen gleichzeitig (Mischspaltung). Man vergleicht dann die Spaltmuster, die mit jeder der beiden Nukleasen entstehen, mit den Fragmenten, die bei der Mischspaltung entstehen. Enthält ein Fragment, das mit einer Nuklease erhalten wird eine Erkennungssequenz für die andere Nuklease, so fehlt dieses Fragment in der Mischspaltung und wird durch zwei neue Bruchstücke ersetzt. Die Summe der Längen dieser beiden neuen Fragmente entspricht dann der Länge des gespaltenen Fragmentes. Wenn größere DNA-Mengen verfügbar sind, kann man die Spaltstelle für eine zweite Nuklease bestimmen, indem man Restriktionsfragmente, die mit der ersten Nuklease entstehen, isoliert und die isolierten Fragmente mit der zweiten Nuklease spaltet (Nachspaltung).

Mit Hilfe von Partial-, Misch- und Nachspaltungen wurde eine physikalische Karte von pWZ61 erstellt (Abb.10). Diese Abbildung ist herausklappbar. Die entstehenden Fragmente sind nummeriert, wobei die Nummern die Lage der Fragmente auf der physikalischen

Karte angeben. Die Fragmentlängen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Im Falle von pWZ61 wurde die Lokalisation der einzelnen Spaltstellen dadurch erleichtert, daß beide Bestandteile dieses rekombinanten Plasmids (pSF2124 und pWZ11) getrennt gespalten und mit dem Spaltmuster von pWZ61 verglichen werden konnten. Außerdem wurden die Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94 (2.2.4.) zur Kartierung herangezogen.

Lage der EcoRI- und BamHI-Spaltstellen: pWZ61 wird von EcoRI in die beiden Ausgangsplasmide pWZ11 (7 100 bp, 1-16) und pSF2124 (11 500 bp, 17-37) gespalten (Abb.6). Die Restriktionsnuklease BamHI spaltet pWZ61 in 3 Fragmente von 7 840 bp (28-3), 5 680 bp (14-27) und 5 000 bp (4-13) (Abb.7). Wie schon im Abschnitt 2.2.1. gezeigt worden ist (Abb.5), liegen zwei der drei BamHI-Spaltstellen im pWZ11-Teil. Die dritte BamHI-Spaltstelle liegt im Tn3-Teil von pSF2124 (Ref.28). Die Lage der BamHI-Spaltstellen, relativ zu den EcoRI-Spaltstellen, kann durch Mischspaltungen von pWZ11, pWZ61 und pSF2124 mit EcoRI und BamHI ermittelt werden: Bei einer EcoRI/BamHI-Mischspaltung von pWZ61 entstehen 5 Fragmente mit Längen von 6 150 bp (28-37), 5 330 bp (17-27), 5 030 bp (4-13), 1 770 bp (1-3) und 310 bp (14-15) (Abb.7). Da eine Mischspaltung von pWZ11 mit EcoRI und BamHI die drei kleineren Fragmente liefert (Abb.5), müssen die beiden größeren Fragmente von 6 150 bp und 5 330 bp aus dem pSF2124-Teil von pWZ61 stammen. Diese Zuordnung wird durch eine EcoRI/BamHI-Mischspaltung von pSF2124 bestätigt, bei der zwei Fragmente der ange-

gegebenen Länge entstehen. Ihre Summe entspricht der Länge der linearisierten pSF2124-DNA.

Die Reihenfolge der Fragmente kann bestimmt werden, indem das größte BamH1-Fragment von pWZ61 (7 840 bp, 28-3 in Abb.10) aus dem Gel isoliert und mit EcoRI nachgespalten wird. Dabei entstehen zwei Fragmente von 6 150 bp (28-37) und 1 770 bp (1-3). Damit ist gezeigt, daß das aus pWZ11 stammende Fragment dem größeren der beiden EcoRI/BamH1-Fragmente von pSF2124 benachbart ist. Da das pWZ11 zugeordnete BamH1-Fragment von 5 030 bp (4-13) keine EcoRI-Spaltstelle besitzt (Abb.5c), muß die zweite EcoRI-Spaltstelle in dem BamH1-Fragment von 5 680 bp (14-17) liegen, d.h. das 310 bp Fragment von pWZ11 muß dem kleineren EcoRI/BamH1-Fragment von pSF2124 (5 330 bp) benachbart sein (Abb.7). Damit liegt die Verteilung der beiden EcoRI- und der drei BamH1-Spaltstellen auf der physikalischen Karte von pWZ61 fest. Bezogen auf die EcoRI-Spaltstelle bei 12 Uhr in Abb.10 ist die Reihenfolge der Fragmente (in bp) -1 770(1-3)-5 030(4-13)-310(14-16)-5 330 (17-27)-6 150(28-37).

Lage der HindIII-Spaltstelle: Die Restriktionsnuklease HindIII spaltet pWZ61 einmal, sodaß ein lineares Molekül entsteht. Die Spaltstelle für HindIII liegt im pWZ11-Teil von pWZ61, da bei einer BamH1/HindIII-Mischspaltung die beiden großen BamH1-Fragmente von 7 840 bp (28-3) und 5 680 bp (14-17) erhalten bleiben,

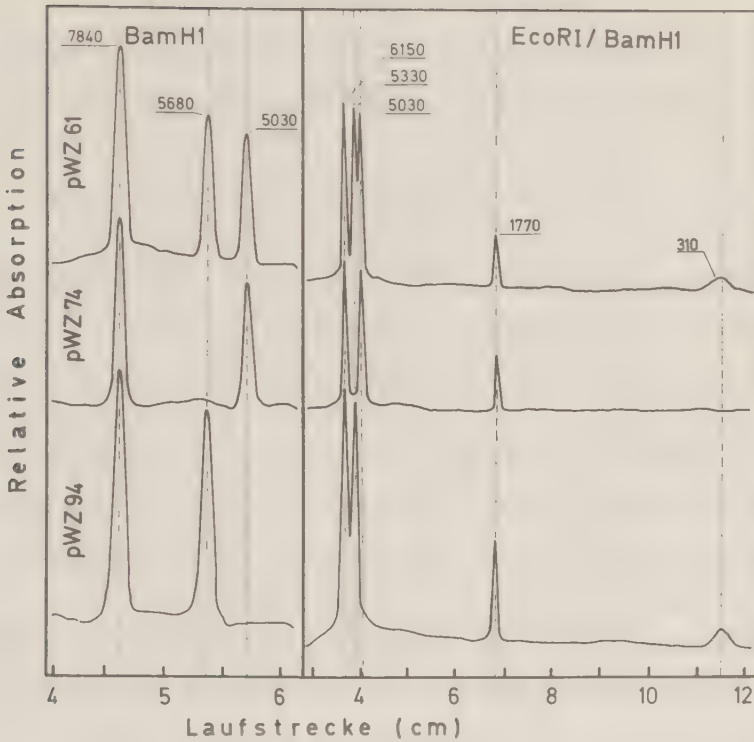


Abb.7 Densitogramme der BamHI-Spaltungen (linke Bildhälfte) und der EcoRI/BamHI-Mischspaltungen (rechte Bildhälfte) von pWZ61 und den beiden Deletionsplasmiden pWZ74 und pWZ94

Die BamHI-Fragmente wurden auf 0,5% Agarose-Plattengelen (4,5 Std.; 3,5 V/cm), die Mischfragmente auf 1,5% Agarose-Plattengelen (2,5 Std.; 6 V/cm) aufgetrennt.

während aus dem BamH1-Fragment von 5 030 bp (4-13) zwei Fragmente von 4 760 bp (4-12) und 310 bp (13) entstehen.

Die Lage der HindIII-Spaltstelle relativ zu den EcoRI-Spaltstellen ergibt sich aus der EcoRI/HindIII-Mischspaltung von pWZ61. Wie erwartet, entsteht dabei die lineare pSF2124-DNA von 11 500 bp (17-37) und zwei pWZ11-Fragmente von 6 480 bp (1-12) und 620 bp (13-16). Da die HindIII-Spaltstelle 310 bp (13) von einer BamH1-Spaltstelle und 620 bp (13-16) von einer EcoRI-Spaltstelle entfernt ist, außerdem das kleinste BamH1-Fragment (5 030 bp; 4-13) von HindIII gespalten wird, ist die Lage der HindIII-Spaltstelle auf der physikalischen Karte von pWZ61 eindeutig festgelegt. Die Reihenfolge der Fragmente, die bei der EcoRI/HindIII-Mischspaltung von pWZ61 entstehen, lautet: -6 480 (1-12)-620(13-16)-11 500(17-37)-; die Reihenfolge der Fragmente, die bei der BamH1/HindIII-Mischspaltung entstehen, lautet: -7 870(28-3)-4 760(4-12)-310(13)-5 700(14-27)-;

Lage der HindII-Spaltstellen: pWZ61 wird von HindII in vier Fragmente von 6 160 bp (29-1), 5 540 bp (10-22), 4 030 bp (2-9) und 2 760 bp (23-28) gespalten. Das HindII-Fragment von 5 540 bp (10-22) wird von EcoRI in zwei Fragmente von 3 170 bp und 2 320 bp gespalten (Abb.8c) und von HindIII in zwei Fragmente von 3 780 bp und 1 710 bp (Abb.8e). Von der HindIII-Spaltstelle ist bekannt, daß sie 620 bp von der EcoRI-Spaltstelle entfernt im

pWZ11-Teil liegt (Position 13-16). Dieses EcoRI/HindIII-Fragment addiert sich mit dem HindIII/HindII-Fragment von 1 710 bp zu dem gefundenen EcoRI/HindII-Fragment von 2 320 bp (10-16). Daraus folgt, daß das EcoRI/HindII-Fragment von 3 170 bp in Position 17-22 liegt. Damit ist die Lage und die Orientierung des HindII-Fragmentes von 5 540 bp (10-22) festgelegt. Das größte HindII-Fragment von 6 160 bp (29-1) wird von EcoRI in zwei Fragmente von 5 510 bp und 710 bp gespalten. Beide Fragmente, das schon kartierte HindII-Fragment von 5 540 bp und das EcoRI/HindII-Fragment von 5 510 bp, haben auf 0,7% Agarosegelen die gleiche Mobilität (vgl. Abb.8b mit 8c). Die Reihenfolge der beiden EcoRI/HindII-Fragmente ergibt sich aus folgender Überlegung. Eines der beiden Fragmente muß aus dem pWZ11-Teil von pWZ61 stammen. Wenn das 5 510 bp EcoRI/HindII-Fragment Teil von pWZ11 ist, dann addiert es sich mit dem schon im pWZ11-Teil lokalisierten EcoRI/HindII-Fragment von 2 320 bp (10-16) zu einer Gesamtlänge, die erheblich größer ist als die gesamte pWZ11-DNA mit 7 100 bp (1-16, Abb.6). Deshalb kann das EcoRI/HindII-Fragment von 5 510 bp nicht Bestandteil von pWZ11 sein, vielmehr liegt es in Position 29-37. Daraus folgt, daß das EcoRI-Fragment von 710 bp in Position 1 liegt. Damit ist auch das größte HindII-Fragment in seiner Lage und Orientierung festgelegt (29-1 in Abb.7). Als Teil von pWZ11 ist bisher das Fragment 1 und 10-16 identifiziert worden. Die Summe ihrer Längen beträgt 3 030 bp. Damit bleibt im pWZ11-Teil (7 100 bp) eine Lücke von 4 070 bp. Diese

Länge entspricht der des HindII-Fragmentes von 4 030 bp. Deshalb ist dieses Fragment in Position 2-9 gelegt worden. Damit ergibt sich für den pWZ11-Teil (stark ausgezogene Linie in Abb.10) folgende Anordnung: Ein EcoRI/HindII-Fragment von 710 bp (1), ein HindII-Fragment von 4 030 bp (2-9) und ein HindII/EcoRI-Fragment von 2 320 bp (10-16). In gleicher Weise läßt sich das vierte HindII-Fragment von 2 760 bp dem pSF2124-Teil von pWZ61 zuordnen. Lokalisiert sind bereits die EcoRI/HindII-Fragmente von 5 510 bp (29-37) und 3 170 bp (17-22). Beide Fragmente addieren sich zu einer Gesamtlänge von 8 680 bp. Die Länge von pSF2124 ist zuvor mit ungefähr 11 500 bp⁺ bestimmt worden (Tabelle 2, Abb.6). Die Differenz der Gesamtlänge von pSF2124 und der beiden EcoRI/HindII-Fragmente ergibt 2 820 bp. Dies entspricht dem kleinsten HindII-Fragment von 2 760 bp, das daraufhin die Position 23-28 einnimmt. Damit sind alle vier HindII-Fragmente von pWZ61 zugeordnet.

Da die Lage der drei BamH1-Spaltstellen bezüglich der HindIII- und der beiden EcoRI-Spaltstellen bekannt ist, und die Lage der HindII-Spaltstellen relativ zu der HindIII- und den beiden EcoRI-Spaltstellen ebenfalls bestimmt ist, kann man die Länge der HindII/BamH1-Fragmente errechnen. Wie erwartet treten bei einer solchen Mischspaltung von pWZ61 sieben Fragmente auf (Abb.8d), deren Längen (Tabelle 2) mit den errechneten Werten übereinstimmen. Dies bestätigt die Richtigkeit der Anordnung der HindII-

⁺ Die Abweichung bei der Bestimmung der Größe von pSF2124 vom angegebenen Wert beträgt 5-8%.



Abb.8: Lokalisierung der HindII-Spaltstellen von pWZ61

Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen in Abb.3.(a) zum Größenvergleich wurde die gleiche DNA wie in Abb.3a aufgetragen. (b) HindII, (c) HindII/EcoRI, (d) HindII/BamH1, (e) HindII/HindIII.

Fragmente in Abb.10.

Lage der PstI-Spaltstellen: pWZ61 wird von PstI in 7 Fragmente A-G gespalten (Abb.9b). Sie wurden auf der physikalischen Karte in Abb.10 wie folgt zugeordnet: A(37-14), B(31-34), C(15-19), D(24-29), E(35-36), F(20-23) und G(30). Das Fragment G wurde auf 6% Acrylamidgelen nachgewiesen. pWZ11 wird von PstI linearisiert, d.h. im pWZ11-Teil von pWZ61 liegt nur eine PstI-Spaltstelle. Die Lage dieser PstI-Spaltstelle wird durch eine EcoRI/PstI/HindIII-Dreifachspaltung bestimmt, bei der u.a. Fragmente von 400 bp und 230 bp entstehen. Da der Abstand der HindIII- von der EcoRI-Spaltstelle 620 bp (13-16) beträgt, ein Fragment dieser Länge aber in der Dreifachspaltung nicht auftaucht, liegt die einzige PstI-Spaltstelle von pWZ11 in dem HindIII/EcoRI-Fragment von 620 bp. Wie die PstI/EcoRI-Spaltung von pWZ61 zeigt (Abb.9h), entsteht ein Fragment von 230 bp. Es liegt in Position 15-16 in Abb.10. Diese Mischspaltung zeigt auch, daß das PstI-Fragment C um etwa 200 bp kleiner wird. Das entstehende EcoRI/PstI-Fragment von 2 820 bp liegt demnach in Position 17-19 in Abb.10. Es besitzt in 0,7% Agarosegelen die gleiche Mobilität wie das PstI-Fragment D mit 2 800 bp (vgl. Abb.9b mit 9c). Damit ist die Lage und die Orientierung des PstI-Fragmentes C (15-19) festgelegt. Bei der EcoRI/PstI-Mischspaltung entsteht außerdem noch ein Fragment von 100 bp (Abb.9h). Da pWZ11 - wie beschrieben - nur eine PstI-Spaltstelle besitzt, liegt eine weitere PstI-Spaltstelle im

pSF2124-Teil im Abstand von 100 bp in Position 37. Der Abstand der PstI-Spaltstelle in Position 36/37 von der PstI-Spaltstelle in Position 14/15 ist gleich der Länge des PstI-Fragmentes A (7 020 bp). Deshalb liegt A in Position 37-14.

Zwei der drei BamH1-Spaltstellen von pWZ61 liegen im PstI-Fragment A. Die entstehenden Fragmente von 1 900 bp (37-3), 5 050 bp (4-13) und 100 bp (14) bestätigen die Richtigkeit der Zuordnung des Fragmentes A zu dem Bereich 37-14. Die dritte BamH1-Spaltstelle im Tn3-Teil von pSF2124 (Position 27/28) liegt in dem PstI-Fragment D (2 800 bp, Abb.9e). Die beiden entstehenden Fragmente sind 1 800 bp und 950 bp lang. Da die BamH1-Spaltstelle 610 bp (28) von der HindII-Spaltstelle entfernt ist und bei einer PstI/HindII-Mischspaltung ein Fragment von 290 bp entsteht, addieren sich das HindII/BamH1- und das PstI/HindII-Fragment ungefähr zu dem PstI/BamH1-Fragment von 950 bp (28-29). Damit ist die Lage und die Orientierung des PstI-Fragmentes D in Position 24-29 festgelegt.

Die vier HindII-Spaltstellen liegen in den PstI-Fragmenten A (zwei Spaltstellen), D und F (Abb.9d). Da die Fragmente A (37-14) und D (24-29) schon zugeordnet sind, können die entstehenden PstI/HindII-Fragmente (Tabelle 2) zur Überprüfung der Kartierung herangezogen werden. Die vierte HindII-Spaltstelle (22/23) liegt im PstI-Fragment F (680 bp). Die Lage der beiden entstehenden

Fragmente von 390 bp (20-22) und 260 bp (23) wird durch HaeII/PstI-Mischspaltungen geklärt, wie sie im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

Die verbleibenden PstI-Fragmente B (3 900 bp, 31-34) und E (1 200 bp, 35-36) liegen im Bereich des größten BamHI-Fragmentes von pWZ61 (28-3), da sie in PstI-Spaltungen von pWZ74 und pWZ94 auftreten. Da beide PstI-Fragmente in pWZ11 fehlen, kann der Bereich auf die Fragmente 29-36 eingeengt werden. Dieser Bereich entspricht der Länge der beiden PstI-Fragmente B und E. Die Länge des Fragmentes E wird durch eine HaeII/PstI-Spaltung deutlich. Dabei wird das PstI-Fragment E (1 200 bp) in zwei Fragmente von 1 120 bp und ungefähr 80 bp gespalten. Da der Abstand der HaeII- zu der EcoRI-Spaltstelle 1 240 bp (36-37) (siehe folgenden Abschnitt) beträgt, liegt das PstI/HaeII-Fragment von 80 bp in Position 35 und das von 1 120 bp in Position 36. Damit ist das PstI-Fragment E (35-36) zugeordnet. Gleichzeitig kann das PstI-Fragment B in die verbleibende Lücke (zwischen Position 31 und 34) gelegt werden.

Das PstI-Fragment G (80 bp) stammt aus dem pSF2124-Teil von pWZ61. Im ColE1-Teil von pSF2124 liegen nur zwei PstI-Spaltstellen (Ref.34), folglich muß das PstI-Fragment G einer der drei PstI-Spaltstellen im Tn3-Teil von pSF2124 benachbart sein. Diese drei Spaltstellen sind schon lokalisiert worden (Position

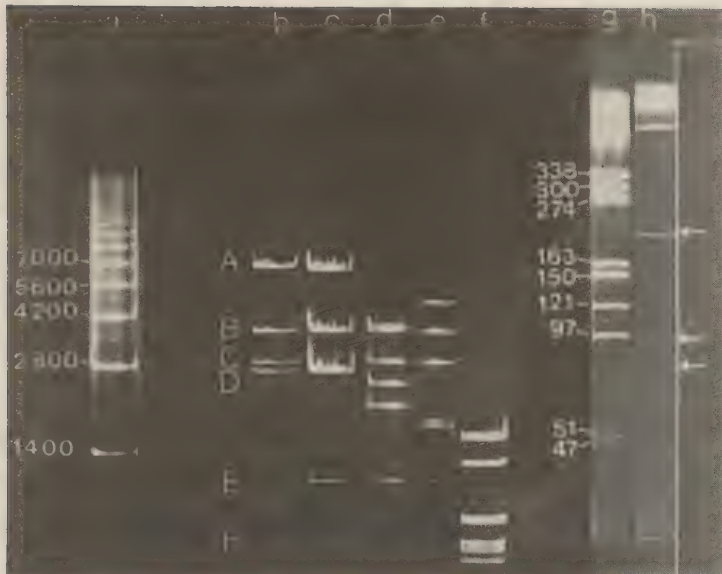


Abb.9: Lokalisierung der PstI-Spaltstellen
in pWZ61

(b) PstI; (c) EcoRI/PstI; (d) HindII/PstI;
(e) BamHI/PstI; (h) EcoRI/PstI; (a) Kalbs-
thymussatelliten-DNA (mit EcoRI partiell
gespalten, Länge in bp); (f) und (g) PM2-
DNA (mit Bsu gespalten, Länge in bp);

Die Trennung der Fragmente erfolgte auf einem 0,7% Agarose-
Plattengel für 3,5 Std. bei 4 V/cm (Bahnen a-f) oder auf 6%
Acrylamid-Plattengelen für 4 Std. bei 8 V/cm (Bahnen g-h).
Die Pfeile in Bahn h geben die Fragmente 15-16, 30 und 37
in Abb.10 an.

19/20, 23/24 und 29/30). Die Nachbarschaft des Fragmentes G zu der PstI-Spaltstelle 19/20 ist wenig wahrscheinlich. Das HaeII-Fragment E (1 580 bp, 19-20; vgl. folgenden Abschnitt) besteht aus dem EcoRI/PstI-Fragment von 1 510 bp (19) und dem HaeII/PstI-Fragment von ungefähr 60 bp (20). Ein Insertion des Fragmentes G von 80 bp bedeutet, daß E aus dem Fragment 19 und 20 plus 80 bp bestehen würde. Die Zunahme des Fragmentes E von 1 580 bp auf 1 660 bp, die auf 0,7% Agarosegelen nachgewiesen werden kann, ist nicht beobachtet worden. Die Nachbarschaft des Fragmentes G zu der PstI-Spaltstelle 23/24 ist ebenfalls wenig wahrscheinlich. Der Abstand der PstI- von der HindII-Spaltstelle beträgt 260 bp (23) und der Abstand der PstI- zu den benachbarten HaeII-Spaltstellen 450 bp (22-23) und 410 bp (24). Die Insertion des PstI-Fragmentes G (80 bp) in Position 23/24 bedeutet, daß das HaeII-Fragment von 900 bp (22-24, vgl. folgenden Abschnitt) aus den Fragmenten 22-23-Fragment G-24 zusammengesetzt sein müßte, was eine Länge von 980 bp ergibt. Eine solche Zunahme von 900 bp auf 980 bp ist auf Gelen nachweisbar und nicht beobachtet worden. Deshalb wurde das PstI-Fragment G in die Position 30 verlegt und wegen seiner indirekten Lokalisation mit einem Stern versehen.

Lage der HaeII-Spaltstellen: Die Restriktionsnuklease HaeII spaltet pWZ61 in 20 Fragmente A-U (Abb.11) Sie wurden auf der

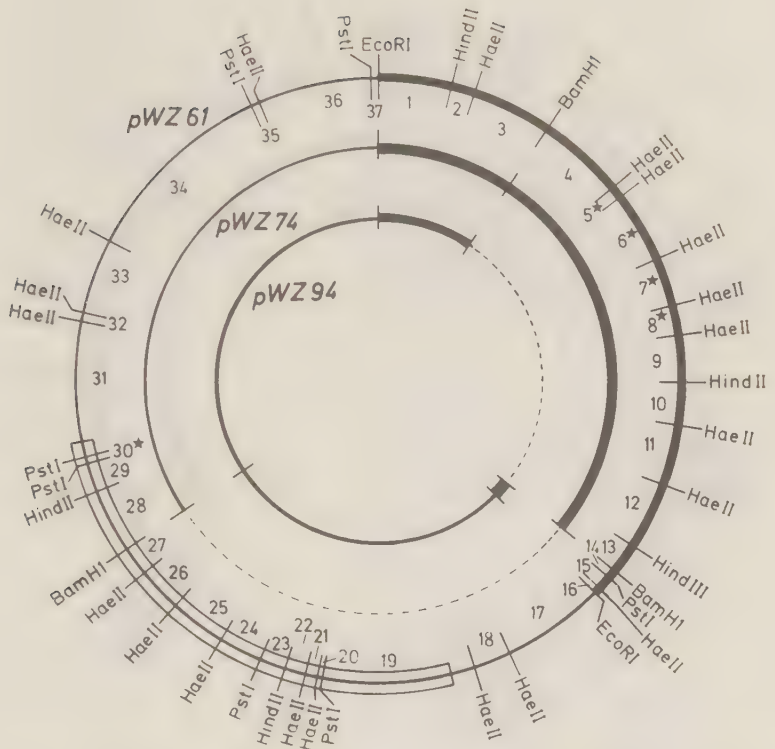


Abb.10: Physikalische Karte von pWZ61 (äußerer Kreis) und der beiden Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94 (innere Kreise)

Der pWZ11-Teil der Plasmide ist durch eine stark ausgezogene Linie hervorgehoben, während die dünnen Linien den pSF2124-Teil kennzeichnen. Die BamH1-Deletionen von pWZ74 und pWZ94 sind durch eine unterbrochene Linie wiedergegeben. Der eingerahmte Bereich in pWZ61 entspricht dem Ampicillin-Transposon Tn3 von pSF2124 (Ref. 28,34). Die Länge der Restriktionsfragmente ist in Tabelle 2 angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Fragmente konnten noch nicht eindeutig festgelegt werden.

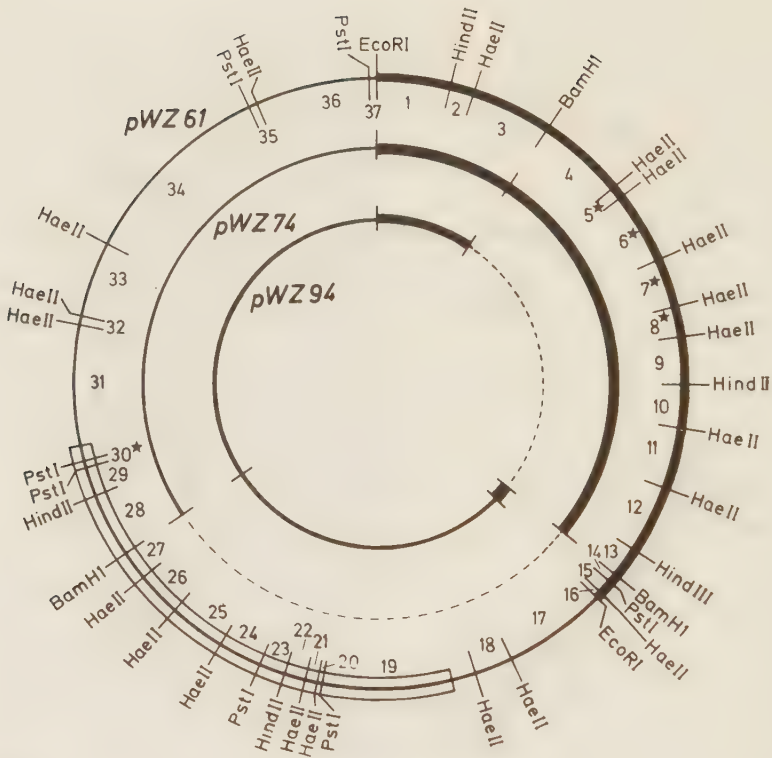


Abb.10: Physikalische Karte von pWZ61 (äußerer Kreis) und der beiden Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94 (innere Kreise)

Der pWZ11-Teil der Plasmide ist durch eine stark ausgezogene Linie hervorgehoben, während die dünnen Linien den pSF2124-Teil kennzeichnen. Die BamHI-Deletionen von pWZ74 und pWZ94 sind durch eine unterbrochene Linie wiedergegeben. Der eingekreiste Bereich in pWZ61 entspricht dem Ampicillin-Transposon Tn3 von pSF2124 (Ref. 28,34). Die Länge der Restriktionsfragmente ist in Tabelle 2 angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Fragmente konnten noch nicht eindeutig festgelegt werden.

Tabelle 2: Länge der DNA-Fragmente, die nach Spaltung von pWZ61-DNA mit Restriktionsnukleasen erhalten wurden.

Die Fragmentlängen (in Basenpaaren, auf 10 auf- oder abgerundet) sind Mittelwerte von 2 bis 8 unabhängigen Bestimmungen und variieren um 3% für Fragmente zwischen 200 und 2000 bp und 5% für Fragmente > 2000 bp und < 200 bp. Die Zahlen in runden Klammern geben die Reihenfolge der Fragmente auf der physikalischen Karte in Abb.10 an; die Fragmentlängen in eckigen Klammern wurden nur einmal bestimmt oder die Abweichung vom Mittelwert beträgt 5%.

Enzym	Fragment	Summe der Fragmente
EcoRI	7100(1-16), 11500(17-37);	18600
BamH1	7840(28-3), 5000(4-13), 5680(14-27);	18520
EcoRI/BamH1	1770(1-3), 5030(4-13), 310(14-15); 5330(17-27), 6150(28-37);	18590
HindII	6160(29-1), 4030(2-9), 5540(10-22), 2760(23-28);	18490
HindIII	18500(13-12);	18500
HindII/EcoRI	710(1), 3990(2-9), 2320(10-16), 3170(17-22), 2750(23-28), 5510(29-37);	18450
HindII/BamH1	6150(29-1), 1070(2-3), 2930(4-9), 2010(10-13), 3500(14-22), 2160(23-27), 610(28);	18430
HindII/HindIII	6120(29-1), 3970(2-9), 1710(10-12), 3780(13-22), 2720(23-28);	18300
HindIII/EcoRI	6480(1-12), 620(13-16), [11500](17-37);	18600
HindIII/BamH1	7870(28-3), 4760(4-12), 310(13), 5700(14-27);	18640

Tab.2 Fortsetzung

PstI	7020(37-14), 3020(15-19), 680(20-23), 2800(24-29), 80(30), 3900(31-34), 1200(35-36);	18700
PstI/EcoRI	6850(1-14), 230(15-16), 2820(17-19), 680(20-23), 2820(24-29), 80(30), 3900(31-34), 1210(35-36), 100(37);	18690
PstI/BamH1	1900(37-3), 5050(4-13), 100(14), 2980(15-19), 670(20-23), 1800(24-27), 950(28-29), 80(30), 3930(31-34), 1210(35-36);	18670
PstI/HindII	800(37-1), 3950(2-9), 2080(10-14), 2970(15-19), 390(20-22), 260(23), 2500(24-28), 290(29), 80(30), 3950(31-34), 1190(35-36);	18460
PstI/HindIII	[6400](37-12), 400(13-14) 3100(15-19), 680(20-23), 2880(24-29), 80(30), 3980(31-34), 1220(35-36);	18740
HaeII	2160(36-2), 1690(3-4), 120(5), 700(6), 500(7), 330(8), 900(9-10), 610(11), 1250(12-15), 1140(16-17), 360(18), 1580(19-20), 130(21), 900(22-24), 550(25), 560(26), 2540(27-31), 80(32), 730(33), 1940(34-35);	18770
HaeII/EcoRI	960(1-2), 1690(3-4), 120(5), 700(6), 500(7), 330(8), 900(9-10), 610(11), 1240(12-15), 80(16), 1030(17), 360(18), 1580(19-20), 130(21), 900(22-24), 550(25), 560(26), 2540(27-31), 80(32), 730(33), 1940(34-35), 1240(36-37);	18770
HaeII/BamH1	2150(36-2), 820(3), 880(4), 120(5), 700(6), 500(7), 330(8), 900(9-10), 610(11), 1010(12-13), 240(14-15), 1140(16-17), 360(18), 1580(19-20), 130(21), 900(22-24), 550(25), 560(26), 300(27), 2160(28-31), 80(32), 730(33), 1940(34-35);	18690

Tab.2 Fortsetzung

HaeII/HindIII	2160(36-2), 1690(3-4), 120(5), 700(6), 500(7), 330(8), 900(9-10), 610(11), 680(12), [550](13-15), 1140(16-17), 360(18), 1580(19-20), 130(21), 900(22-24), 550(25), 560(26), 2540(27-31), 80(32), 730(33), 1940(34-35);	18750
HaeII/HindII	1900(36-1), 220(2), 1690(3-4), 120(5), 700(6), 500(7), 330(8), 440(9), 430(10), 610(11), 1250(12-15), 1140(16-17), 360(18), 1580(19-20), 130(21), 210(22), 700(23-24), 550(25), 560(26), 960(27-28), 1620(29-31), 80(32), 730(33), 1940(34-35);	18750
HaeII/PstI	1040(37-2), 1690(3-4), [120](5), 680(6), 500(7), 320(8), 900(9-10), 610(11), 1080(12-14), [130](15), 1160(16-17), 370(18), 1510(19), [60](20), [130](21), 450(22-23), 410(24), 540(25), 560(26), 1240(27-29), [80](30), 1310(31), 730(33), 1860(34), [80](35), 1120(36);	18680
Mittelwert:		18609 bp

physikalischen Karte in Abb.10 wie folgt zugeordnet: A(27-31), B(36-2), C(34-35), D(3-4), E(19-20), F(12-15), G(16-17), H(9-10), J(22-24), K(33), L(6), M(11), N(26), O(25), P(7), Q(18), R(8), S(21), T(5) und U(32).

Die Reihenfolge der Fragmente kann durch den Vergleich der Spaltmuster von pSF2124, pWZ11, pWZ74 und pWZ94 ermittelt werden. Die beiden Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94 sind in Abschnitt 2.2.4. beschrieben. Für die Kartierung wichtig ist die Tatsache, daß in pWZ74 das BamH1-Fragment 14-27 und in pWZ94 das BamH1-Fragment 4-13 von pWZ61 fehlt (Abb.10, innere Kreise).

Die HaeII-Fragmente B (2 160 bp, 36-2) und G (1 140 bp, 16-17) werden von EcoRI gespalten. Aus Fragment B entstehen zwei Fragmente von 1 270 bp und 960 bp, aus G zwei Fragmente von 1 030 bp und 80 bp. Die beiden größten der vier Mischfragmente werden auch in einer HaeII/EcoRI-Mischspaltung von pSF2124, die beiden kleineren in einer HaeII/EcoRI-Mischspaltung von pWZ11 erhalten. Das EcoRI/HaeII-Mischfragment von 80 bp liegt in Position 16. In einer HaeII/BamH1-Mischspaltung (s.unten) entsteht ein Fragment von 240 bp, das zusammen mit dem 80 bp EcoRI/HaeII-Fragment das schon bestimmte EcoRI/BamH1-Fragment von 310 bp (14-16) ergibt. Damit ist die Lage und die Orientierung des HaeII-Fragmentes G (16-17 in Abb.10) festgelegt. Aus der Lage des Fragmentes G folgt, daß Fragment B in Position 36-2 liegt, wobei das 960 bp EcoRI/HaeII-Fragment aus pWZ11 in Position 1-2 liegt.

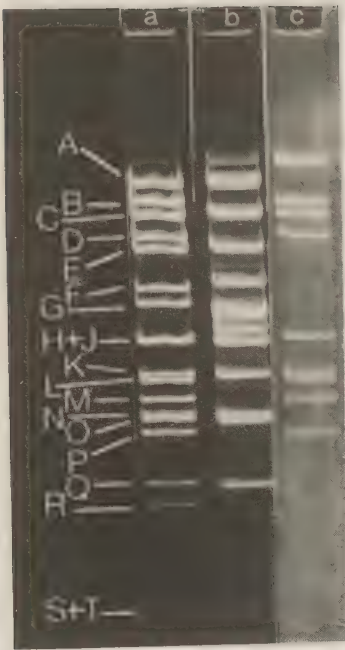


Abb.11: HaeII-Spaltung von
pWZ61 (a), pWZ94 (b)
und pWZ74 (c)

Die Fragmente wurden auf 2% Agarose-Plattengelen für 2,5 Std. bei 6 V/cm aufgetrennt. Fragment U (80 bp) konnte in diesem Gel nicht nachgewiesen werden (siehe Text).

Die HaeII-Fragmente A, D und F werden von BamH1 gespalten. Aus dem Fragment A (2 540 bp, 27-31), das auch bei der HaeII-Spaltung von pSF2124 gefunden wird, entstehen zwei Fragmente von 2 160 bp und 300 bp. Die BamH1-Stelle im pSF2124-Teil von pWZ61 ist schon bestimmt worden und somit ist die Lage des Fragmentes A festgelegt. Die Orientierung des Einbaus ergibt sich

durch eine HaeII/HindII-Mischspaltung von pWZ61. Dabei entsteht u.a. ein Fragment von 960 bp. Da der Abstand der HindII- von der BamHI-Spaltstelle bekannt ist (610 bp, 28), ergibt die Differenz des HaeII/HindII-Fragmentes und des BamHI/HindII-Fragmentes die Länge des gefundenen HaeII/BamHI-Fragmentes von 300 bp. Dieses Fragment liegt in Position 27 und legt die Orientierung des HaeII-Fragmentes A eindeutig fest. Das HaeII-Fragment D (1 690 bp, 3-4) wird von BamHI in zwei Fragmente von 880 bp und 820 bp gespalten. Diese beiden Fragmente entstehen auch bei der Mischspaltung von pWZ11 mit HaeII und BamHI. Da der Abstand der EcoRI- von der BamHI-Spaltstelle 1 770 bp beträgt (1-3) und die beiden Mischfragmente, die aus dem Fragment D entstehen, keine EcoRI-Spaltstelle besitzen, liegt das Fragment D in Position 3-4. Aus der Differenz der Abstände des EcoRI/BamHI-Fragmentes (1 770 bp, 1-3) und des EcoRI/HaeII-Fragmentes (960 bp, 1-2) ergibt sich, daß das HaeII/BamHI-Fragment von 820 bp in Position 3 und folglich das HaeII/BamHI-Fragment von 880 bp in Position 4 liegt. Das HaeII-Fragment F (1 250 bp, 12-15) wird von BamHI in zwei Fragmente von 1 010 bp und 240 bp gespalten, die beide ein Teil von pWZ11 sind. Die Lage der HaeII-Spaltstelle relativ zur BamHI- und EcoRI-Spaltstelle ist schon bei der Lokalisierung des HaeII-Fragmentes G bestimmt worden. Somit ist die Lage und die Orientierung des Fragmentes F (12-15) gegeben.

Die Fragmente A (27-31), B (36-2), H (9-10) und J (22-24) werden von HindII gespalten. Fragment A und B sind schon auf der physi-

kalischen Karte in Abb.10 zugeordnet; der Abstand der HindII-Spaltstellen zu der BamHI-Spaltstelle (in Fragment A,28) bzw. zu der EcoRI-Spaltstelle (in Fragment B,1) ist zuvor bestimmt worden. Fragment H (900 bp, 9-10), das auch bei einer HaeII-Spaltung von pWZ11 entsteht, wird von HindII in zwei Fragmente von 440 bp und 430 bp gespalten. Da im pWZ11-Teil nur noch einer der beiden HindII-Spaltstellen (Position 9/10) kein HaeII-Fragment zugeordnet worden ist, liegt Fragment H in Position 9-10, wobei über die Orientierung keine Aussage gemacht werden kann. Fragment J (900 bp, 22-24), das auch bei HaeII-Spaltung von pSF2124 entsteht, wird von HindII in zwei Fragmente von 700 bp und 210 bp gespalten. Da nur noch einer der vier HindII-Spaltstellen von pWZ61 keine HaeII-Fragmente zugeordnet worden sind, kann das Fragment J nur in Position 22-24 liegen. Die Orientierung wird durch eine HaeII/PstI-Mischspaltung festgelegt. PstI spaltet das Fragment J in zwei Fragmente von 450 bp und 410 bp. Da der Abstand der HindII- von der PstI-Spaltstelle 260 bp (Position 23) und der Abstand der HindII- von der HaeII-Spaltstelle 210 bp (Position 22) beträgt, addieren diese beiden Fragmente zu dem gefundenen HaeII/Pst-Fragment von 450 bp (22-23) und legen damit die Orientierung des HaeII-Fragmentes J (22-24) fest.

Damit sind die HaeII-Fragmente A, B, D, F, G, H und J auf der physikalischen Karte von pWZ61 festgelegt. Die HaeII-Fragmente L, P, R und T, die auch bei einer HaeII-Spaltung von pWZ11 ent-

stehen, enthalten keine Spaltstelle für eine der zur Kartierung benutzten Restriktionsnukleasen. Die Reihenfolge dieser Fragmente kann deshalb durch Mischspaltungen nicht bestimmt werden. Die Summe der Fragmentlängen in L, P, R und T füllt die Lücke zwischen den Fragmenten 4 und 9 in Abb.10 aus. Deshalb sind diese Fragmente in Position 5-8 angeordnet und mit einem Stern versehen. Die Lücke zwischen den HaeII-Spaltstellen 9/10 und 11/12 beträgt 610 bp. Dieser Abstand entspricht der Länge des HaeII-Fragmentes M aus pWZ11. Deshalb wurde Fragment M in Position 11 angeordnet. Das HaeII-Fragment Q ist dem pSF2124-Anteil des Fragmentes G benachbart (Ref.32) und liegt deshalb in Position 18. In die sich daran anschließende Lücke von 1 780 bp (die Differenz des EcoRI/HaeII-Fragmentes 17-18) können die HaeII-Fragmente E (1 580 bp, 19-20) und S (130 bp, 21) gelegt werden. Die Reihenfolge von E und S ergibt sich aus einer HaeII/PstI-Mischspaltung, bei der u.a. ein Fragment von 60 bp entsteht (auf 6% Acrylamidgelen nachgewiesen). Dieses Fragment entsteht, wenn Fragment S in Position 21 liegt. Würde an dieser Stelle Fragment E liegen, so müßte ein HaeII/PstI-Fragment von 220 bp entstehen. Ein solches Fragment ist nicht gefunden worden. Die HaeII-Fragmente N (560' bp) und O (550 bp) sind als Teil des Ampicillin-Transposons (der eingerahmte Bereich in Abb.10) beschrieben (Ref.33). Sie wurden deshalb in die Positionen 26 (N) und 25 (O) gelegt. Aus der HaeII-Restriktionskarte von ColE1 (Ref.32) ist die Reihenfolge der Fragmente C, K und U bekannt.

Sie füllen die Lücke zwischen dem HaeII-Fragment A (27-31) und B (36-2) aus. U liegt in Position 32, K in Position 33 und C in Position 34-35. Damit sind alle 20 HaeII-Fragmente von pWZ61 bestimmten Positionen der physikalischen Karte in Abb.10 zugeordnet. Fragmente, die aus HindII/EcoRI/HaeII- und HindII/BamHI/HaeII-Dreifachspaltungen erhalten worden sind, bestätigen die Lage der HaeII-Fragmente.

Zusammenfassung: Spaltung von pWZ61 mit 6 Restriktionsnukleasen:

Das Plasmid pWZ61, das durch in vitro Verknüpfung von EcoRI-gespaltener pWZ11-DNA (2.2.2.) und dem ColE1-Tn3-Faktor pSF2124 entstanden ist, wurde mit den sechs Restriktionsnukleasen EcoRI, BamHI, HindII, HindIII, HaeII und PstI gespalten und die Größe und die Lage der entstehenden Fragmente bestimmt (Tabelle 2 und Abb.10). Die Spaltung mit EcoRI zerlegt pWZ61 wieder in pWZ11 und pSF2124 (Abb.6). Die Restriktionsnuklease HindIII spaltet pWZ61 einmal, BamHI dreimal (Abb.7), HindII viermal (Abb.8), PstI siebenmal (Abb.9) und HaeII zwanzigmal (Abb.11).

pWZ61 wird von den Restriktionsnukleasen SalI und BglII nicht gespalten, während mit HpaII, AluI, HaeIII und Sau3A so viele Fragmente entstehen, daß eine Kartierung mit den beschriebenen Methoden (siehe Beginn des Abschnitts) nur schwer möglich ist. Aus dem Mittelwert der Summen der Fragmente in Tab.2 ergibt sich für pWZ61 eine Gesamtlänge von $18\,609 \pm 132$ bp, was einem Molekulargewicht von ca. $21,4 \times 10^6$ entspricht.

2.2.4. Lokalisierung des Trimethoprim-Resistenzgens durch Konstruktion der Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94

Da pWZ61 sowohl den Replikationsstartpunkt des ColE1-Faktors enthält, als auch den Replikationsstartpunkt von pWZ11, können Deletionsplasmide auf Trimethoprim-haltigen Medien selektioniert werden, bei denen alle R388-Sequenzen deletiert sein können, mit Ausnahme des Trimethoprim-Resistenzgens. Voraussetzung für die in vitro Konstruktion von Deletionsplasmiden mit Hilfe von Restriktionsnukleasen ist es, daß das Trimethoprim-Resistenzgen keine Erkennungssequenz für die benutzte Restriktionsnuklease besitzt. Wie die physikalische Karte von pWZ61 (Abb.10) zeigt, ist für eine weitere Verkleinerung des pWZ11-Teils von pWZ61 die Restriktionsnuklease BamH1 am besten geeignet:

1. zwei der drei BamH1-Spaltstellen liegen im pWZ11-Teil von pWZ61;
2. die dritte BamH1-Spaltstelle liegt nicht im Replikationsstartpunkt von pSF2124 (Ref.28);
3. die Restriktionsnuklease BamH1 spaltet DNA unter Ausbildung von kohäsiven Einzelstrangenden (Ref.35);

Aus diesen Gründen wurde pWZ61 mit BamH1 gespalten und die drei bei der Spaltung entstehenden Fragmente (Abb.7) in vitro ligiert. Mit dem Fragmentgemisch wurde E.coli C transformiert. Die Selektion erfolgte auf Trimethoprim- und Ampicillin-haltigen Platten. Von 35 untersuchten Transformanten waren 19 sensitiv (Typ I) und 16 resistent gegen ColicinE1 (Typ II). Von 10 Transformanten

jedes Typs wurde die DNA isoliert und die Größe der Plasmide auf Agarosegelen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die DNA von 12 Plasmiden deutlich kleiner war als die von pWZ61. Vier dieser Deletionsplasmide kamen aus Transformanten des Typs I, die restlichen acht aus Zellen des Typs II. Die Spaltung der Plasmid-DNA mit BamH1 ergab, daß alle Plasmide des Typs I aus 2 Fragmenten von 7 840 bp (28-3) und 5 030 bp (4-13) zusammengesetzt waren. Wie aus dem Densitogramm der BamH1-Spaltung (Abb.7) hervorgeht, fehlt in den Plasmiden des Typs I (pWZ74) das BamH1-Fragment von 5 680 bp. Die DNA aller 8 Plasmide des Typs II (pWZ94) war aus den BamH1-Fragmenten von 7 840 bp (28-3) und 5 680 bp (14-27) zusammengesetzt. In pWZ94 fehlt das BamH1-Fragment von 5 030 bp (4-13). Dem Ausgangsplasmid pWZ61 und den beiden Deletionsplasmiden pWZ74 und pWZ94 ist nur das 7 840 bp BamH1-Fragment (28-3) gemeinsam (Abb.7; Abb.10, innere Kreise). Daraus folgt, daß auf diesem Restriktionsfragment sowohl das Gen für die Ampicillin-Resistenz von pSF2124 als auch das Gen für die Trimethoprim-Resistenz von R388 liegen muß. Die Mischspaltung von pWZ61 mit EcoRI und BamH1 zeigt (Abb.7), daß das 7 840 bp BamH1-Fragment aus einem pSF2124-Teil von 6 150 bp (28-37) und einer R388-Sequenz von 1 770 bp (1-3) zusammengesetzt ist (Abb. 10). Daraus folgt, daß auf diesem EcoRI/BamH1-Fragment das Trimethoprim-Resistenzgen liegen muß. Da Zellen mit pWZ94 immun gegen ColicinE1 sind, muß überdies die Immunitätsregion des ColE1-Faktors auf dem 5 680 bp BamH1-Fragment liegen (Abb.7; Abb.10; vgl. 3.2.).

Bei der Spaltung der Plasmide des Typs II zeigte sich, daß eines der acht Plasmide (pWZ75) zwar mit BamH1 und mit EcoRI/BamH1, nicht aber jedoch mit EcoRI ein für pWZ94 charakteristisches Spaltmuster ergab. Mit EcoRI entstehen im Gegensatz zu pWZ94 zwei Fragmente von 7 100 bp und 6 460 bp. Daraus folgt, daß in pWZ75 eine Inversion des 5 680 bp BamH1-Fragmentes (14-27) stattgefunden haben muß, d.h. die Immunitätsregion des ColE1-Teils von pWZ61 ist in pWZ75 dem Trimethoprim-Resistenzgen direkt benachbart.

2.2.5. Versuche zur Zirkularisierung des BamH1-Fragmentes von 7 840 bp

Die DNA aller 20 untersuchten Transformanten (2.2.4.) war größer als das größte BamH1-Fragment von pWZ61 mit 7 840 bp (28-3). Zum Zeitpunkt der Versuche war bekannt, daß der Replikationsstartpunkt des ColE1-Faktors 18% von der EcoRI-Spaltstelle entfernt lag (Ref.30). Da die Ausbeute an pWZ74-DNA nach Amplifizierung mit Chloramphenicol um den Faktor 10 über der Ausbeute an R388-DNA lag und pWZ61 und pWZ74 nur das BamH1-Fragment von 7 840 bp gemeinsam war, wurde geschlossen, daß der Replikationsstartpunkt des ColE1-Faktors auf diesem BamH1-Fragment liegen muß (vgl. Diskussion 3.2.). Unter dieser Voraussetzung sollte ein Plasmid, das nur aus dem größten BamH1-Fragment besteht, Trimethoprim-resistent sein (es enthält das als Resistenzgen identifizierte

EcoRI/BamH1-Fragment von 1 770 bp), sich selbst vermehren können und ColicinE1-sensitiv sein (es fehlt das BamH1-Fragment von 5 680 bp, auf dem die Colicinimmunität liegt). Es wurde deshalb eine Reihe von Versuchen durchgeführt, mit dem Ziel, dieses BamH1-Fragment in vitro zu zirkularisieren.

pSF2124 wurde mit EcoRI und BamH1 gespalten und das Restriktionsfragment von 6 150 bp (28-37 in Abb.10) aus dem Gel isoliert. Dieses Fragment wurde in vitro mit dem isolierten 1 770 bp EcoRI/BamH1-Fragment ligiert. Nach Transformation von E.coli C mit dem Fragmentgemisch wurden die Zellen auf Trimethoprim-Resistenz (Tp) und Verlust der ColicinE1 Immunität ($Ice1^-$) geprüft. Es wurden keine Transformanten dieses Phänotyps gefunden.

In einem weiteren Versuch wurde das 7 840 bp BamH1-Fragment (28-3) von pWZ61 aus dem Gel isoliert, in vitro ligiert und nach Transformation von kompetenten Zellen mit dem Fragmentgemisch, die Transformanten auf Tp und $Ice1^-$ selektioniert. Auch bei diesem Versuchsansatz wurden keine Transformanten gefunden, die in der Lage waren, auf Trimethoprim-haltigen Medien zu wachsen, obwohl nach der Ligasereaktion sowohl das zirkuläre 7 840 bp-Fragment, als auch höhere Oligomere dieses Fragmentes auf Gel nachgewiesen werden konnten. Dies bedeutet zumindest, daß nach Extraktion des BamH1-Fragmentes aus dem Gel die kohäsiven Einzelstrangenden intakt gewesen waren und in der Ligasereaktion diese Enden z.T. wieder verknüpft worden sind.

Um Schädigungen der DNA durch die Gelelektrophorese und die nachfolgenden Isolierungsbedingungen auszuschließen, wurde versucht, durch Ligierung von Fragmentgemischen - ohne Auftrennung im Gel - das BamH1-Fragment zu zirkularisieren. Dazu wurde pWZ94-DNA mit BamH1 gespalten (Abb.7) und das Gemisch der beiden entstehenden Fragmente von 7 840 bp und 5 680 bp ohne vorherige Trennung ligiert. Alle 189 untersuchten Transformanten waren wie das Ausgangsplasmid pWZ94 (2.2.4) immun gegen ColicinE1.

Kein Plasmid hatte das 5 680 bp-Fragment verloren, ein Ringschluß des 7 840 bp Fragmentes hatte nicht stattgefunden.

In weiteren Versuchen wurde pWZ74-DNA mit BamH1 und HindIII gespalten und ligiert. Die BamH1-Spaltung lieferte das 7 840 bp und das 5 030 bp Fragment (Abb.10). Das letztere enthält eine HindIII-Spaltstelle. Bei der BamH1/HindIII-Mischspaltung von pWZ74 hat also nur das 7 840 bp Fragment zwei BamH1-Enden, während die beiden anderen entstehenden Fragmente je ein BamH1- und ein HindIII-Ende besitzen (Abb.12). Eine Zirkularisierung des BamH1-Fragmentes von 7 840 bp sollte begünstigt sein, da ein BamH1/HindIII-Ringschluß nicht möglich ist und für eine BamH1-BamH1-Verknüpfung sich zuvor die beiden HindIII-Enden der beiden kleineren Fragmente richtig zusammenlagern müssen (Abb.12). Nach der Ligasereaktion wurde mit dem Fragmentgemisch E.coli C transformiert und die Transformanten auf Trimethoprim-haltigen Platten selektioniert. Da schon das Ausgangsplasmid pWZ74 ColicinE1-

sensitiv war, war eine Selektion auf Verlust der ColicinE1-Immunität - wie im Falle von pWZ94 - nicht möglich. Deshalb wurde die Größe der Plasmide von 71 Trimethoprim-resistenten Transformanten nach EcoRI-Spaltung auf Gelen bestimmt. Die Untersuchung einer so großen Zahl von Plasmiden wurde erst möglich, nachdem Techniken entwickelt worden waren, mit deren Hilfe die Größe der Plasmide direkt im klaren Lysat bestimmt werden konnte (Ref.36). Keines der untersuchten Plasmide hatte eine Länge von 7 840 bp, ein Ringschluß hatte auch bei diesem Versuch nicht stattgefunden. Die wiederholt negativen Ergebnisse, ein Plasmid zu isolieren, das nur noch das 7 840 bp BamH1-Fragment enthält, können dadurch erklärt werden, daß der Replikationsstartpunkt des ColE1-Teils von pSF2124 nicht auf dem größeren der beiden EcoRI/BamH1-Fragmente liegt, sondern der Colicin E1-Immunitäts-region benachbart ist (vgl. Diskussion, 3.2.). Wie die physikalische Karte von pWZ61 zeigt (Abb.10), müßte das R388-Fragment von 1 770 bp (1-3) mit dem EcoRI/BamH1-Fragment von 5 330 bp (17-27) aus dem pSF2124-Teil verknüpft werden. Ein solcher Ringschluß ist mit pWZ75-DNA leicht möglich. Wie in 2.2.4. gezeigt wurde, entstehen nach EcoRI-Spaltung von pWZ75 zwei Fragmente, von denen das größere (7 100 bp) aus dem 1 770 bp EcoRI/BamH1-Fragment von R388 und dem 5 330 bp EcoRI/BamH1-Fragment von pSF2124 zusammengesetzt ist. Eine Zirkularisierung dieses EcoRI-Fragmentes würde zu Plasmiden des Phänotyps Tp, Ap⁻ und Ice1⁻ führen. Auf die Konstruktion dieses Plasmids wurde verzichtet,

zugunsten des direkten Einbaus des 1 770 bp-Fragmentes in pSF2124, um so den endgültigen Beweis zu liefern, daß dieses Fragment das Trimethoprim-Resistenzgen von R388 trägt.

2.2.6 Einbau_des_Dimeren_in_pSF2124

Da zum Zeitpunkt der Versuche kein geeignetes Plasmid zum Einbau von Fragmenten mit einem EcoRI- und einem BamHI-Ende zur Verfügung stand, mußte das 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragment dimerisiert werden, um in die EcoRI-Spaltstelle von pSF2124 eingebaut werden zu können. In Abb.12 sind die Teilschritte der in vivo Dimerisierung und des Einbaus dargestellt. Wie in 2.2.5. wurde pWZ74-DNA mit BamHI und HindIII gespalten. Von den drei entstehenden Fragmenten von 7 840 bp (28-3), 4 760 bp (4-12) und 310 bp (13) besitzt nur das 7 840 bp-Fragment zwei BamHI-Enden. Bei der nachfolgenden Ligasereaktion kann dieses Fragment entweder ein Kopf-Kopf-Dimer bilden (Abb.12, linke Bildhälfte) und liefert nach EcoRI-Spaltung ein Dimer des 1 770 bp-Fragmentes mit 2 EcoRI-Enden. Falls sich die beiden BamHI-Fragmente zu einem Kopf-Schwanz-Dimer zusammenlagern (Abb.12, rechte Bildhälfte), entsteht nach EcoRI-Spaltung ein umarrangiertes 7 840 bp-Fragment mit zwei EcoRI-Enden. Nach Einbau dieser Fragmente in pSF2124 wurde E.coli C mit dem Fragmentgemisch transformiert und die Transformanten auf Tp, Icc1 und Ccl⁻ geprüft. Die DNA-Größe von 23 Plasmiden dieses Phänotyps wurde auf 0,5% Agarosegelen untersucht. Es zeigte sich, daß weder ein Dimer des 1 770 bp-Fragmentes, noch das

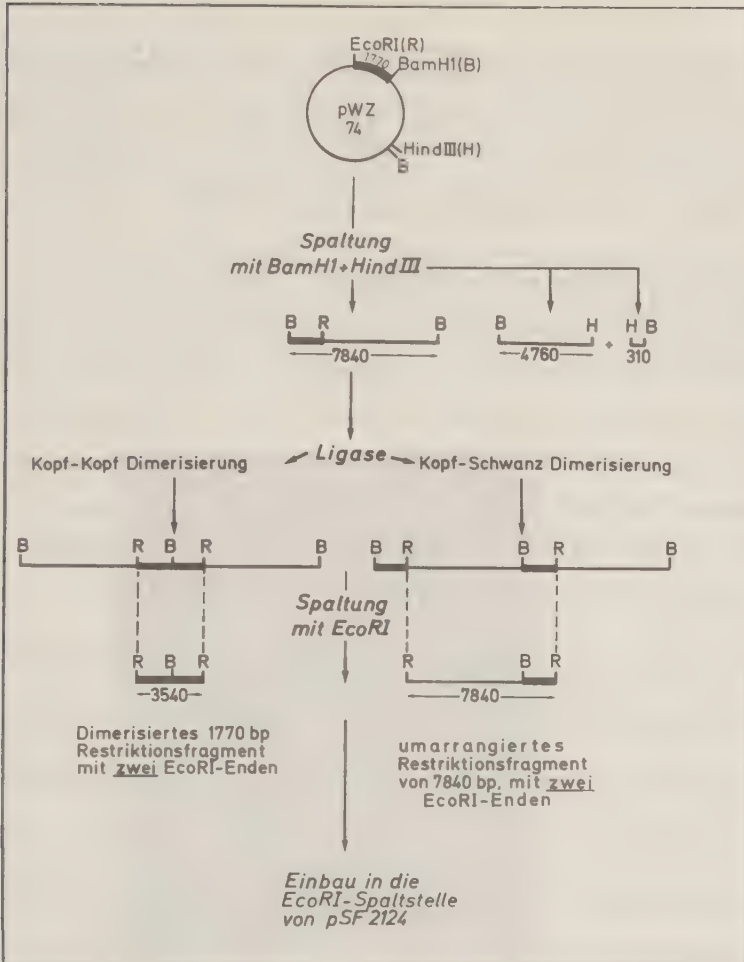


Abb.12: Schema der Dimerisierung des EcoRI/BamHI-Fragmentes von 1 770 bp (linke Bildhälfte) und der Umwandlung eines Restriktionsfragmentes von 7 840 bp mit zwei BamHI-Enden in ein gleich großes Restriktionsfragment mit zwei EcoRI-Enden (rechte Bildhälfte)

7 840 bp-Fragment mit den beiden EcoRI-Enden eingebaut worden war. Die DNA von 3 Plasmiden war kleiner als die von pSF2124. Das kleinste gefundene Plasmid (pWZ703) hatte eine Länge von 3 200 bp. Es wird in Abschnitt 2.2.9. beschrieben.

Die Tatsache, daß kein dimerisiertes 1 770 bp-Fragment in pSF2124 eingebaut worden war, war möglicherweise auf zu geringe Dimerkonzentration nach der Ligasereaktion zurückzuführen, oder darauf, daß klonierte Palindrome nicht stabil sind. Um die erste Möglichkeit auszuschließen, wurde im folgenden Versuch das 1 770 bp-Fragment isoliert und in vitro dimerisiert. Dazu wurde pWZ94-DNA mit EcoRI und BamH1 gespalten (Abb.7, rechte Bildhälfte), die Fragmente auf präparativen Agarosegelen getrennt, das 1 770 bp-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und aus den Gelscheiben durch Elektrophorese isoliert (4.8.). Die Ausbeute an reinem 1 770 bp-Fragment (Abb.13b) betrug 33-50%. Das isolierte Fragment mit einem EcoRI- und einem BamH1-Ende wurde in Gegenwart von EcoRI ligiert, sodaß nur eine BamH1-BamH1-Verknüpfung stattfinden konnte und das sich bildende Dimer zwei EcoRI-Enden besitzen mußte (analog Abb.12, linke Bildhälfte). Der Einbau dieses Dimers in die EcoRI-Spaltstelle von pSF2124 führte zu hybriden Plasmiden des Phänotyps Tp, Ap, Ce1⁻, Ice1. Diese Plasmide waren der direkte Beweis, daß das Monomer von 1 770 bp aus R388 allein in der Lage ist, die Trimethoprim-Resistenz zu exprimieren. Zehn Plasmide dieses Phänotyps wurden isoliert. In allen

Plasmiden waren Teile eines Monomerendeletiert. Die Verkürzung zeigte sich bei einem Plasmid (pWZ651) nach einer EcoRI/BamH1-Mischspaltung besonders deutlich (Abb.13a). Ein EcoRI/BamH1-Monomer von 1 770 bp war ungeschädigt vorhanden, das Zweite war um 385 bp verkürzt (vgl. Abb.13a und b). Genaueren Aufschluß über die Deletion in dem zweiten Monomer gab eine HindII/BamH1-Spaltung des isolierten verkürzten Dimeren. Bei dieser

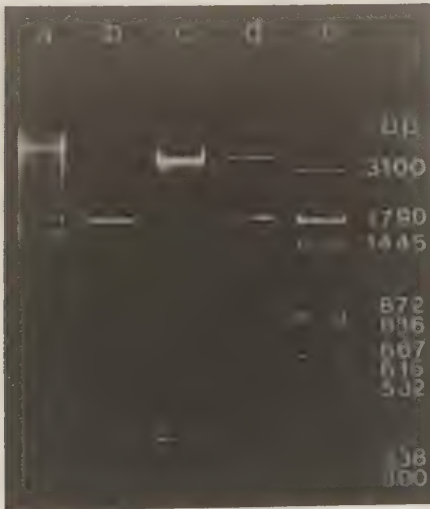


Abb.13: EcoRI/BamH1-Mischspaltung des klaren Lysates von pWZ651 (a), der DNA von pBR322 (c) und pWZ820 (d)

In (b) wurde das isolierte EcoRI/BamH1-Fragment von 1 770 bp aufgetragen, in (e) λ dv21-DNA (mit EcoRI gespalten) und PM2-DNA (mit Bsu gespalten). Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen in Abb.11.

Spaltung entstanden vier Fragmente von 1 060 bp, 710 bp, 1 015 bp und 370 bp. Die ersten beiden Fragmente waren identisch mit den Fragmenten, die bei einer HindII-Spaltung des isolierten 1 770 bp-Fragmentes erhalten wurden (Abb.14). Die beiden Fragmente von 1 015 bp und 370 bp bildeten den verkürzten Teil des zweiten Monomeren. Da sowohl das EcoRI/HindII-Fragment als auch das HindII/BamH1-Fragment verkürzt waren, mußten an zwei Stellen Deletionen im gleichen Monomer stattgefunden haben.

2.2.7. Einbau des isolierten 1 770 bp EcoRI/BamH1-Fragmentes in pBR322

Um das 1 770 bp-Fragment zu amplifizieren, wurde versucht, dieses Fragment in andere Vektoren einzubauen, deren Kopienzahl über der von pSF2124 liegt. Ein solcher Vektor ist pBR322 (Ref. 37), in den zudem EcoRI/BamH1-Fragmente direkt eingebaut werden können. pBR322 hat ein Molekulargewicht von $2,6 \times 10^6$, trägt die Gene für die Tetracyclin- und Ampicillin-Resistenz und besitzt nur noch eine EcoRI- und eine BamH1-Spaltstelle, die 385 bp voneinander entfernt liegen. Der Ersatz dieses 385 bp EcoRI/BamH1-Fragmentes durch fremde DNA inaktiviert das Tetracyclin-Resistenzgen von pBR322.

In dem folgenden Versuch wurde das 385 bp-Fragment von pBR322 (Abb.13c) durch das isolierte 1 770 bp-Fragment (Abb.13b) ersetzt und die Transformanten auf Trimethoprim- und Ampicillin-Resistenz und Verlust auf Tetracyclin-Resistenz geprüft. Die EcoRI/BamHI-Mischspaltung von 25 Plasmiden dieses Phänotyps zeigte, daß in 23 Fällen das intakte 1 770 bp-Fragment eingebaut worden war (pWZ820, Abb.13d). Die beiden restlichen Plasmide waren erheblich größer als pWZ820 und gaben nach der EcoRI/BamHI-Mischspaltung ein komplexes Spaltmuster. Sie wurden deshalb nicht weiter untersucht.

2.2.8. Kartierung des isolierten Restriktionsfragmentes mit 6 Restriktionsnukleasen

Wie von der physikalischen Karte von pWZ61 bekannt ist, besitzt das 1 770 bp-Fragment mit dem Trimethoprim-Resistenzgen (Fragment 1-3 in Abb.10) je eine Spaltstelle für die Restriktionsnuklease HindII und HaeII. Die HindII-Spaltstelle ist 710 bp (1) und die HaeII-Spaltstelle 945 bp (1-2) von der EcoRI-Spaltstelle entfernt (Abb.14b, 14c und Abb.15). Mit BglII entstehen 5 Partialfragmente (Abb.14e) von 1 240 bp (A), 940 bp (B), 830 bp (C), 530 bp (D) und 300 bp (E). Die Längen der Fragmente D und E addieren sich zu der Länge des Partialfragmentes C, die Längen der Fragmente B und E zu der Länge des Partialfragmentes A. Da das BglII-Fragment B (940 bp) die HindII-Spaltstelle besitzt (das

BglI/HindII-Fragment ist 225 bp lang), liegt die Reihenfolge der BglI-Fragmente relativ zur EcoRI-Spaltstelle mit B-E-D fest. Bei der Spaltung des 1 770 bp-Fragmentes mit der Restriktionsnuklease Sau3A entstehen 7 Fragmente von 640 bp (A), 295 bp (B), 280 bp (C), 210 bp (D), 180 bp (E), 145 bp (F) und ungefähr 40 bp (G). Die Spaltung ist in Abb.14g gezeigt. Die HindII-Spaltstelle liegt in dem Sau3A-Fragment A, die beiden entstehenden Fragmente sind 445 bp und 185 bp. Die Lücke zwischen dem EcoRI-Ende des 1 770 bp-Fragmentes und der Sau3A-Spaltstelle, die 445 bp von der HindII-Spaltstelle entfernt liegt (Abb.15) hat die Größe des Sau3A-Fragmentes C (280 bp). Das Fragment F (145 bp) wird von HaeII in zwei Fragmente von 125 bp und 25 bp gespalten (das kleinere Fragment konnte auf Agarosegelen nicht nachgewiesen werden). Da der Abstand der HindII- von der HaeII-Spaltstelle 225 bp beträgt (Abb.14c und Tab.2) und zuvor ein HindII/Sau3A-Fragment von 185 bp gefunden worden ist, liegt die Orientierung des Sau3A-Fragmentes F fest. Die Reihenfolge der Sau3A-Fragmente vom EcoRI-Ende her lautet somit: -C-A-F-. Das Sau3A-Fragment G (40 bp) ist auch in pWZ703 enthalten (2.2.9.) und schließt an das Fragment F an (Abb.15). Die restlichen Sau3A-Fragmente B, D und E konnten noch nicht eindeutig festgelegt werden. Nach der physikalischen Karte in Abb.15 muß das Fragment B eine BglI-Spaltstelle besitzen. Eine Sau3A/BglI-Mischspaltung ist jedoch nicht durchgeführt worden. Die beiden dem BamHI-Ende benachbarten Sau3A-Spaltstellen sind in Abb.15 mit einem Stern gekennzeichnet.

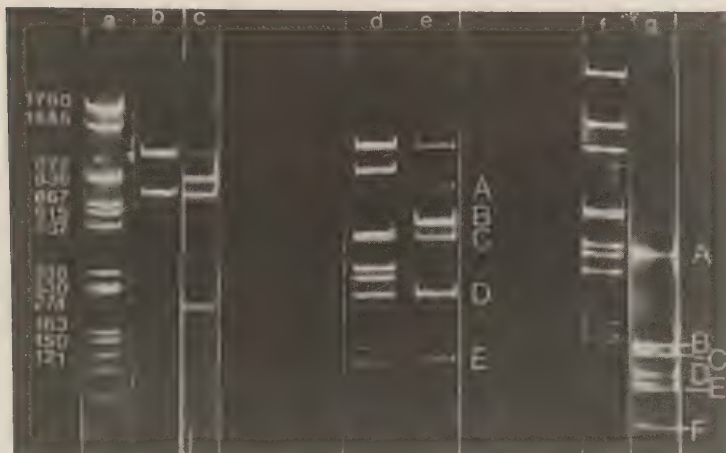


Abb.14: Spaltung des isolierten 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragmentes mit verschiedenen Restriktionsnukleasen

(b) HindII; (c) HindII/HaeII; (e) BglI; (g) Sau3A;

In (a), (d) und (f) wurde PM2-DNA (mit Bsu gespalten) aufgetragen. In (f) wurde zusätzlich noch λ dv21 (3 100 bp, linearisiert mit EcoRI) aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen der Bahnen a-c und f-g entsprechen denen in Abb.11. Die Fragmente in den Bahnen d und e wurden auf 1,5% Agarose-Plattengelen für 3 Std. bei 5 V/cm aufgetrennt.

Das 1 770 bp-Fragment hat keine Spaltstelle für die Restriktionsnukleasen BglIII, HindIII, PstI, SalI und XbaI und wenigstens 9 Spaltstellen für HhaI, 8 für HaeIII und je 4 für HpaII und AluI. Ihre Lage konnte noch nicht festgelegt werden.

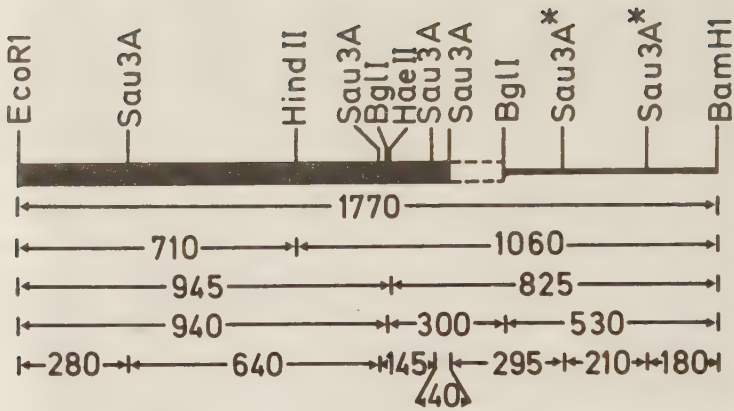


Abb.15: Physikalische Karte des isolierten 1 770 bp-Fragmentes

Der stark ausgezogene Teil zwischen dem EcoRI-Ende und einer Sau3A-Spaltstelle ist auch in pWZ703 (Abb.17) enthalten. Der unterbrochen gezeichnete Teil zwischen einer Sau3A- und einer BglI-Spaltstelle ist zu Teilen in pWZ703 enthalten; der weniger stark ausgezogene BglI/BamHI-Teil fehlt in pWZ703. Die Lage der Sau3A-Spaltstellen, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, konnten noch nicht endgültig bestimmt werden. Die Abstände der Spaltstellen sind in bp angegeben.

2.2.9 In vivo Deletion eines Teils des 1 770 bp-Fragmentes (pWZ703)

Bei der Dimerisierung des 1 770 bp-Fragmentes und dem Einbau in die EcoRI-Spaltstelle von pSF2124 (vgl. Schema in Abb.12) wurden drei Plasmide gefunden, die erheblich kleiner waren als der Vek-

tor pSF2124. Das kleinste Plasmid (pWZ703) hatte noch eine Länge von 3 200 bp. pWZ703 wird von den Restriktionsnukleasen EcoRI, HindII und BglI je einmal gespalten. Eine EcoRI/BamHI-Mischspaltung liefert ein lineares Molekül. Dies zeigt, daß das 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragment nicht mehr ungeschädigt in pWZ703 vorliegen kann. Eine EcoRI/HindII-Mischspaltung liefert das schon bestimmte Fragment von 710 bp (Fragment 1 in Abb.10; Fragment 1-2 in Abb.17; Abb.16h), eine EcoRI/HaeII-Mischspaltung das schon bekannte Fragment von 945 bp (Fragment 1-2 in Abb.10; Fragment 1-5 in Abb.17; Abb.16b), eine EcoRI/BglI-Mischspaltung das Fragment von 940 bp (1-4 in Abb.17).

pWZ703 wird von HaeII in drei Fragmente von 1 930 bp (Fragment 10-5 in Abb.17), 900 bp (6-8) und 360 bp (9) gespalten (Abb.16c). EcoRI spaltet das größte der drei Fragmente, dessen Lage und Orientierung damit festliegt. Das HaeII-Fragment von 360 bp (Fragment 9 in Abb.17) trägt den Replikationsstartpunkt von ColE1 und ist identisch mit dem Fragment 18 in Abb.10. Die folgenden Sau3A-Spaltungen zeigen, daß dieses Fragment keine Erkennungssequenz für Sau3A besitzt, sodaß dieses Fragment dem größten HaeII-Fragment benachbart ist. Die Reihenfolge der HaeII-Fragmente liegt mit -1 930 bp - 900 bp - 360 bp - fest (Abb.17).

pWZ703 wird von Sau3A in 7 Fragmente gespalten. Sie liegen auf der physikalischen Karte von pWZ703 in Abb.17 wie folgt: 730



Abb.16: Spaltung von pWZ703 mit Restriktionsnukleasen

(b) EcoRI/HaeII; (c) HaeII; (d) HaeII/Sau3A;
(e) HaeII/HindII; (f) Sau3A; (g) EcoRI/Sau3A;
(h) EcoRI/HindII; (i) EcoRI;

In (a) und (k) ist PM2-DNA (mit Bsu gespalten) und λ dv21-DNA (mit EcoRI gespalten, 3 100 bp) aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen in Abb.11.

(13-1), 640(2-3), 145(4-6), 40(7), 1 390(8-10), 85(11) und 135 (12) (Abb.16f). EcoRI spaltet das Sau3A-Fragment von 730 bp in zwei Fragmente von 440 bp (13 in Abb.17) und das schon als Teil des 1 770 bp-Fragmentes identifizierte Fragment von 280 bp (Abb. 15; Abb.16g). Auch die beiden Fragmente von 450 bp (Fragment 2

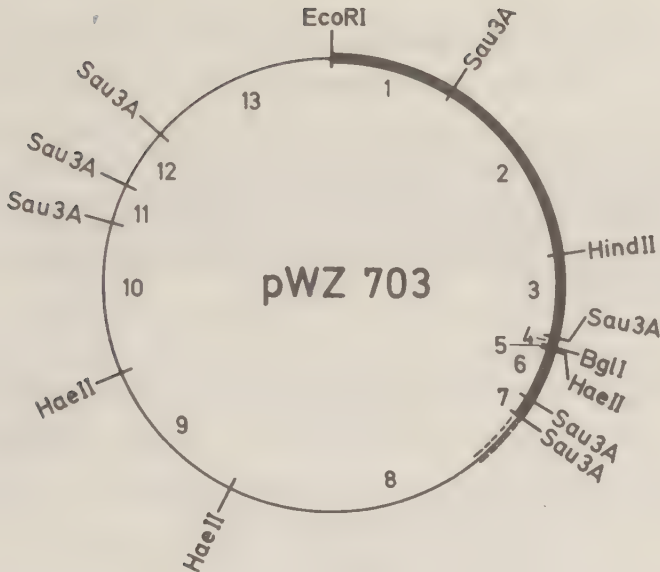


Abb.17: Physikalische Karte von pWZ703

Der stark ausgezogene Teil des Plasmids ist in dem isolierten 1 770 bp EcoRI/BamH1-Restriktionsfragment (Abb.15) enthalten; der pSF2124-Anteil von pWZ703 ist durch eine dünne Linie wiedergegeben. Der durch eine unterbrochene Linie gekennzeichnete Teil des Fragmentes 8 gibt an, welcher Teil noch aus dem 1 770 bp-Fragment stammen kann. Die Längen der Fragmente 4 und 5 konnten nicht genau bestimmt werden (vgl. Tab.3 und Text). Die Größe der einzelnen Fragmente ist in Tab.3 angegeben.

Tabelle 3: Länge der Restriktionsfragmente, die nach Spaltung von pWZ703 erhalten wurden.

Die Fragmentlängen (in Basenpaaren) sind Mittelwerte aus 2 bis 6 unabhängigen Bestimmungen (vgl. Tab.2). Die Zahlen in runden Klammern geben die Reihenfolge der Fragmente in Abb.17 an; die Fragmente in eckigen Klammern wurden nicht bestimmt, sie ergeben sich aus der Differenz benachbarter Fragmente (siehe Text). Fragmente mit einem Stern wurden nur einmal bestimmt.

Enzym	Fragment	Summe der Fragmente
HaeII	1930(10-5), 900(6-8), 360(9);	3190
Sau3A	730(13-1), 640(2-3), 145(4-6), 40*(7), 1390(8-10), 85(11), 135(12);	3165
HaeII/EcoRI	950(1-5), 880(6-8), 370(9), 1020(10-13);	3220
HaeII/HindII	1700(10-2), 225(3-5), 885(6-8), 355(9);	3165
HaeII/Sau3A	725(13-1), 640(2-3), [25](4-5), 125(6), 40*(7), 710(8), 360(9), 340(10), 85(11), 135(12);	3185
HindII/Sau3A	745(13-1), 450(2), 180(3), 150(4-6), [40](7), 1360(8-10), 85(11), 140(12);	3150
EcoRI/Sau3A	285(1), 650(2-3), 150(4-6), [40](7), 1400(8-10), 90(11), 135(12), 440(13);	3190
Mittelwert:		3180 bp

in Abb.17) und 180 bp (3), die bei der HindII-Spaltung des Sau3A-Fragmentes von 640 bp entstehen, sind Teil des 1 770 bp-Fragmentes (Abb.15), ebenso wie die beiden Fragmente von 125 bp (6 in Abb.17) und 25 bp (4-5 in Abb.17), die bei einer HaeII-Spaltung des Sau3A-Fragmentes von 145 bp entstehen. Das Sau3A-Fragment von 40 bp (7) ist sowohl in pWZ703 als auch in dem 1 770 bp-Fragment enthalten. Das größte Sau3A-Fragment von 1 390 bp (8-10 in Abb.17) wird von HaeII zweimal gespalten, die entstehenden Fragmente sind 710 bp (8), 360 bp (9) und 340 bp (10) lang. Sie sind in dem 1 770 bp-Fragment nicht enthalten; die Lage dieser Fragmente ist durch die Lage der drei HaeII-Spaltstellen festgelegt. Die Sau3A-Fragmente 11 (85 bp) und 12 (135 bp) füllen die Lücke zwischen den Sau3A-Spaltstellen in Position 10/11 und 12/13 in Abb.17. Ihre Reihenfolge ergibt sich aus Sau3A-Partialspaltungen. Die zweite BglI-Spaltstelle, die im Abstand von 1 240 bp von dem EcoRI-Ende des 1 770 bp-Fragmentes liegt (Abb.15), ist in pWZ703 nicht vorhanden. Das bedeutet, daß die 530 bp des 1 770 bp-Fragmentes, die dem BamHI-Ende benachbart sind, in pWZ703 fehlen. Von den 300 bp, die die beiden BglI-Spaltstellen in dem 1 770 bp-Fragment voneinander entfernt liegen, sind in pWZ703 die Fragmente 5-7 vorhanden, d.h. von dem HaeII-Fragment 8 in Abb.17 können maximal 115 bp (unterbrochene Linie in Abb.15 und Abb.17) aus dem 1 770 bp-Fragment stammen. Daraus folgt, daß in pWZ703 mindestens 1 135 bp (stark ausgezogene Linie in Abb.15 und Abb.17) und höchstens 1 240 bp (Ende der unter-

brochenen Linie in Abb.15 und Abb.17) von dem 1 770 bp-Fragment enthalten sind. Die Lage der Spaltstellen von EcoRI, HindII, HaeII, BglI und Sau3A ist auf der physikalischen Karte von pWZ703 in Abb.17 angegeben, die Länge der entstehenden Fragmente in Tabelle 3 aufgeführt.

2.2.10. Schematische Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und der Versuche, die zur Identifizierung des Dihydrofolatreduktase-Gens führten

Die stufenweise Verkleinerung des R-Faktors R388, die Entstehung der verschiedenen rekombinanten Plasmide, ihre Eigenschaften und die Versuche, die mit diesen Plasmiden durchgeführt wurden, sind in Abb.18a und 18b zusammengestellt. Die Nummern geben die Abschnitte in dieser Arbeit an, in denen die Plasmide beschrieben werden. Die Abkürzungen der Plasmid-Marker sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Die EcoRI-Spaltstellen sind mit R, die BamHI-Spaltstellen mit B abgekürzt.

Identifizierung und Charakterisierung des 1770 bp Fragmentes

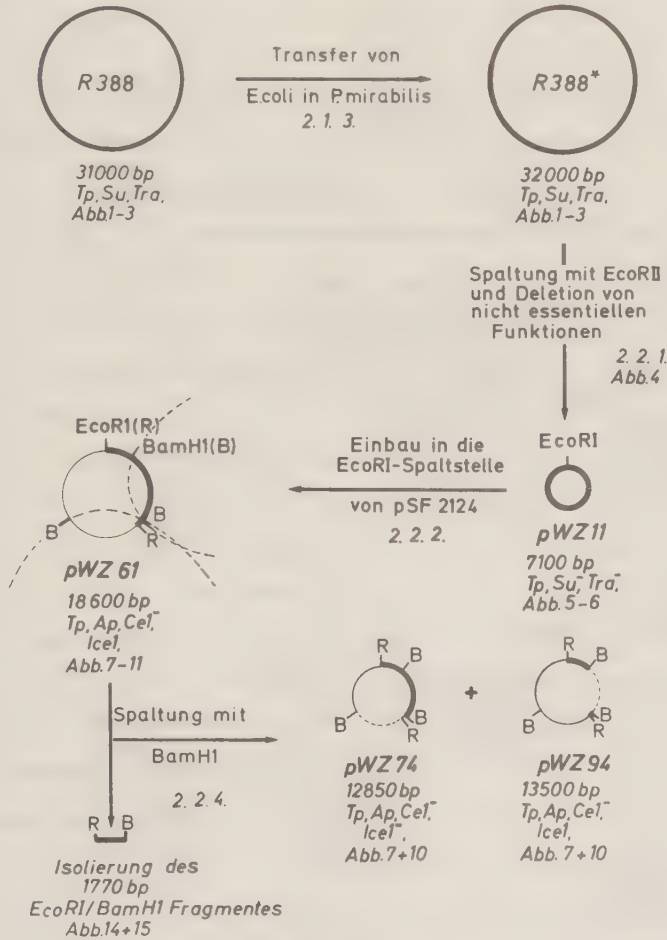


Abb. 18a

Identifizierung des Dihydrofolatreduktase-Gens

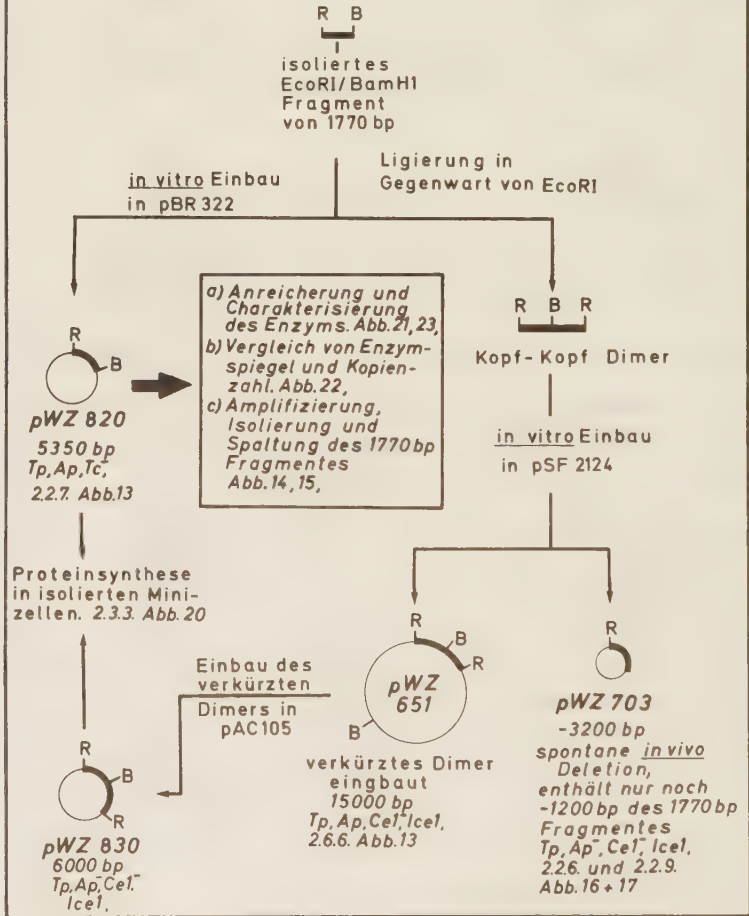


Abb.18b

2.3. Liegt das Strukturgen für eine Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase auf dem Plasmid R388?

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, daß die in vivo Expressionen der Trimethoprim-Resistenz an das Vorhandensein des EcoRI/BamHI-Restriktionsfragmentes (oder an Teile davon bei pWZ703) gekoppelt sind, sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob R388 oder das beschriebene Restriktionsfragment das Strukturgen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase enthält. Diese Frage ist von Bedeutung, da als Alternativmöglichkeit in Betracht gezogen werden muß, daß einmal die in der Zelle schon vorliegende Wirts-Dihydrofolatreduktase durch Plasmid-codierte Enzyme so verändert wird, daß dieses Enzym nunmehr resistent gegen Trimethoprim ist (Modifizierung), oder aber unter der Kontrolle des Plasmids ein zweiter Genort auf dem Wirtschromosom aktiviert wird, dessen Produkt das resistente Enzym ist (Aktivierung). Gegen die Modifizierung und Aktivierung sprechen die Befunde, daß Zellen mit dem R-Faktor R388 eine zweite Dihydrofolatreduktase enthalten, die 10 000 mal resistenter gegen Trimethoprim ist als das Wirtsenzym (16) und dessen Molekulargewicht mit 35 000 von dem des E.coli-Enzyms mit ca. 16 000-20 000 verschieden ist. Chromosomale Resistenz wird im Gegensatz zu der Plasmid-codierten Resistenz in einigen Fällen durch eine gesteigerte Enzymsynthese hervorgerufen (10,38).

Erste Hinweise, daß die Plasmide das Strukturgen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase enthalten, ergeben sich aus folgender Beobachtung: Die Trimethoprim-Resistenz (1 mg/ml) wird von den R-Faktoren R388, R388[#] und pWZ11 sowohl in E.coli als auch in P.mirabilis in gleicher Weise exprimiert. Beide Wirte sind aber sowohl in ihrer DNA-Zusammensetzung (G+C Gehalt), als auch in einer Reihe von Stoffwechselreaktionen voneinander verschieden. Eine Modifizierung des schon vorhandenen Enzyms oder eine Aktivierung eines zweiten Genortes scheint dadurch weniger wahrscheinlich. Die Frage nach dem Strukturgen wurde mit vier methodischen Ansätzen angegangen: Suche nach Mutanten mit einer temperatursensitiven Dihydrofolatreduktase (2.3.1.); in vitro Transkription und Translation der Plasmid-DNA (2.3.2.); in vivo Expression des Enzyms in isolierten Minizellen (2.3.3.); Vergleich von Enzymspiegel und Kopienzahl (2.3.4.).

2.3.1. Isolierung von Mutanten mit einer temperatursensitiven Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase

E.coli 114 (R388) wurde mutagenisiert (4.5.) und unter den Überlebenden Zellen solche selektioniert, die bei 28°C in Gegenwart von 1 mg/ml Trimethoprim wachsen konnten, aber bei Erhöhung der Temperatur auf 42°C kein Wachstum mehr zeigten (28+/42-). Die Tatsache, daß alle weiteruntersuchten Kolonien auf Trimethoprim-

freien Medien wachsen konnten stellte sicher, daß die Mutation in der Plasmid- und nicht in der Wirts-DNA erfolgt war.

In den ersten Versuchen, die von der Annahme ausgingen, daß R388 nur in einer Kopie pro Zelle vorliegt, wurden keine Kolonien des Phänotyps (28+/42-) gefunden. Die Kolonien zeigten allenfalls ein verzögertes Wachstum während der ersten 16 Std. bei 42°C im Vergleich zu 28°C. Nach 48 Std. war in keinem Fall ein Wachstumsunterschied zwischen den beiden Inkubationstemperaturen sichtbar. Da die Zahl der R388-Kopien zwischen 1-5 pro Zelle zu variieren scheint (Ref.39 und 2.3.4.), konnten stabile Strukturgen-Mutanten nur dann erwartet werden, wenn die Mutation in allen Plasmidkopien einer Zelle gleichzeitig erfolgt. Drei Kolonien, die in den ersten 16 Std. einen Wachstumsunterschied zeigten, wurden angezogen (3 l Kulturen) und nach Sephadex G75-Chromatographie (Abb.21) die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase auf ihre Temperatursensitivität geprüft. Keine der drei Mutanten besaß eine temperatursensitive Dihydrofolatreduktase.

Deshalb wurde in weiteren Versuchen, der Selektion auf Plasmide mit einer temperatursensitiven, Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase, ein Transferschritt vorgeschaltet. R388 in E.coli 1114 wurde nach der Mutagenese in den Streptomycin-resistenten Stamm E.coli JC7623 übertragen und E.coli JC7623 (R388) auf Trimethoprim- und Streptomycin-haltigen Platten bei 28°C

selektioniert. Durch einen modifizierten Stempel (4.7.) war es möglich, eine große Anzahl von Kolonien auf zwei Trimethoprim-haltige Platten zu übertragen. Eine der beiden Platten wurde bei 28°C, die andere bei 42°C inkubiert. Es zeigte sich, daß etwa eine Kolonie pro Platte bei 42°C nicht mehr wachsen konnte. Alle 125 Kolonien dieses Phänotyps, die gefunden wurden, waren instabil. Nach mehrmaligem Ausstreichen auf Trimethoprim-haltigen Platten und Inkubation bei 28°C und 42°C waren die Kolonien wieder in der Lage, bei 42°C zu wachsen. Mit Hilfe dieser Mutanten konnte die Frage nach dem Strukturgen auf dem R-Faktor R388 nicht beantwortet werden.

2.3.2. Versuche zum Nachweis der Dihydrofolatreduktase in einem
DNA-abhängigen *in vitro* Proteinsynthese-System

Als weiteren Nachweis des Strukturgens wurde versucht, Plasmid-DNA in einem in vitro System zu transkribieren und translatieren. Dazu wurde das E.coli-System nach Trimble et al. (40) benutzt, in das bis zu 1,5 µg DNA der Plasmide R388, R388^{*}, pWZ11 und pWZ820 und des isolierten Restriktionsfragmentes von 1 770 bp eingesetzt wurden. Diese Versuche wurden von Frau G. Combriato durchgeführt. In keinem Fall konnte die Synthese von Trimethoprim-resistenter Dihydrofolatreduktase nachgewiesen werden. Als interne Kontrolle des Systems diente T4-DNA.

2.2.3. in vivo Expression der Plasmid-codierten Dihydrofolat- reduktase in isolierten Minizellen -----

Da in Minizellen keine chromosomale DNA enthalten ist, und somit nur die Plasmid-DNA als Matritze zur RNA- und Proteinsynthese zur Verfügung steht, sind isolierte Minizellen häufig dazu benutzt worden, die Synthese von Plasmid-codierten Proteinen zu untersuchen (36, Übersicht Ref.41). Der Vergleich der [^{14}C] markierten Proteine, die von den Plasmiden pBR322 und pWZ820 (2.2.7.; Abb.13 und Abb.18) in Minizellen synthetisiert werden, sollte Aufschluß darüber geben, ob das Dihydrofolatreduktase-Gen auf dem 1 770 bp-Fragment transkribiert und translatiert wird. Der Nachweis eines Proteins von der Größe der Dihydrofolatreduktase (Molekulargewicht: 35 000, Ref.16) wäre ein Beweis für das Vorhandensein des Strukturgens auf dem Restriktionsfragment.

Der Einbau von [^{14}C] Aminosäuren in säurefällbares Material erfolgte in isolierten Minizellen über 90 Min. linear (Abb.19B). Der Einbau konnte sechsfach gesteigert werden durch den Ersatz des Hefehydrolysats in dem benutzten Minimalmedium (36) durch die Aminosäuren, die in dem markierten Gemisch fehlten, und die Erniedrigung ihrer Konzentration auf 1 $\mu\text{g/ml}$ (vgl. Abb.19A und 19B). Von der Gesamtradioaktivität, die eingesetzt wurde, fanden sich 1-3% in dem säurefällbaren Material. Dies ist in guter Übereinstimmung mit anderen Autoren (42).

Der Vergleich der Proteine aus Minizellen mit pBR322 und pWZ820 (Abb.20) zeigt, daß nur ein Protein mit dem Molekulargewicht von 31 000 in pWZ820 zusätzlich auftritt (Abb.20B, Pfeil), das im Vektor pBR322 (Abb.20A) fehlt. Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich nicht um die Plasmid-codierte Dihydrofolatreduktase, da in späteren Versuchen mit teilweise gereinigtem Enzym (4.12.) ein Protein dieser Größe nicht gefunden wurde. Auf SDS-Gelen fanden sich vier Hauptbanden mit Molekulargewichten von 8 000, 26 000, 29 000 und 84 000 und drei minore Proteinbanden mit Molekulargewichten von 12 000, 20 000 und 56 000 (U.J. Hänggi, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zu den $[^{14}\text{C}]$ -markierten Proteinen (Abb.20) waren nach Einbau von $[^{35}\text{S}]$ Methionin in die Proteine nur noch 10 Banden auf den Autoradiogrammen zu sehen, die alle sowohl in Minizellen mit pBR322 als auch in Minizellen mit pWZ820 vorhanden waren. Um eine mögliche Überlappung der neu synthetisierten Dihydrofolatreduktase mit den Vektor-codierten Proteinen zu vermeiden, wurde das verkürzte Dimer (2.2.6. und Abb. 18b) in pAC105 eingebaut. Von diesem Vektor war bekannt, daß alle Proteine, die von ihm codiert werden, ein Molekulargewicht von weniger als 20 000 besitzen (Ref.43). Die spezifische Radioaktivität des verfügbaren $[^{14}\text{C}]$ Aminosäuregemisches (50 mCi/mMol) war zu gering, um damit die wenigen von pAC105 codierten Proteine nachweisen zu können. Deshalb wurden die Proteine mit $[^{35}\text{S}]$ Methionin (660 Ci/mMol) markiert. Es wurden in Minizellen mit pAC105 drei Proteine nachgewiesen, die alle auch in Minizellen mit pWZ830 (Abb.18b) vorhanden waren.

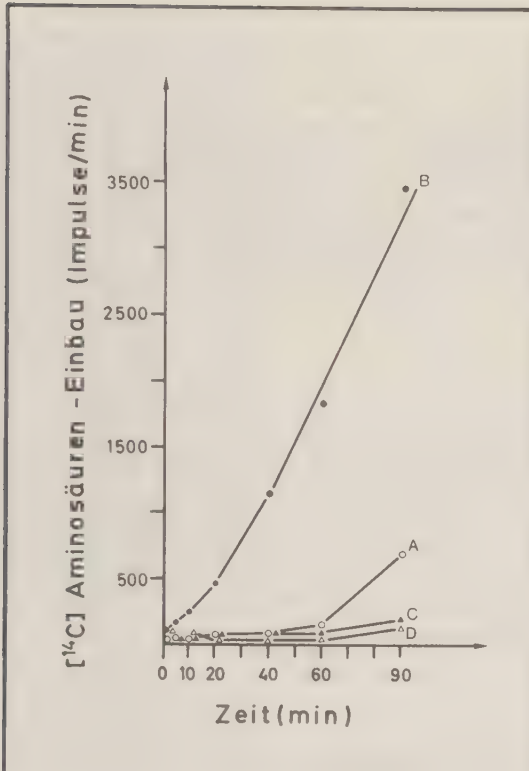


Abb.19: Einbau von $[^{14}\text{C}]$ Aminosäuren in Proteine, die in isolierten Minizellen synthetisiert werden

- A: Minizellen mit pWZ820 in Minimalmedium (36) mit Zusatz von Hefehydrolysat (1% Endkonzentration) und unmarkierten Aminosäuren ($50 \mu\text{g/ml}$);
- B: Wie A, jedoch ohne Hefehydrolysatzzusatz und $1 \mu\text{g/ml}$ derjenigen Aminosäuren, die in dem radioaktiven Gemisch nicht enthalten waren;
- C: wie A, Minizellen ohne Plasmid
- D: wie B, Minizellen ohne Plasmid

Zu Abb.19:

Die Isolierung der Minizellen und die Einbaubedingungen sind in Abb.20 beschrieben. Zu den angegebenen Zeiten wurden 5 μ l der Suspension mit 10 ml eiskalter Trichloressigsäure (5% w/v) gefällt, auf Whatman-Filter (GF/C) übergeführt, die Filter mit 10 ml eiskaltem Äthanol gewaschen; für 15 Min. bei 120°C getrocknet und in 5 ml Szintillationsmischung (5 gr Permablend III, Packard Instrument , Zürich, in 1 l Toluol dest. gelöst) gezählt.

Ein Protein, dessen Molekulargewicht 15 000 überstieg, wurde weder mit pAC105 noch mit pWZ830 gefunden. Damit war es durch den Vergleich der in Minizellen synthetisierten Proteine nicht möglich, die Frage nach dem Strukturgen auf dem 1 770 bp-Fragment zu klären (vgl. Diskussion 3.5.).

2.3.4. Vergleich der Menge an Dihydrofolatreduktase von E.coli
(R388) und E.coli (pWZ820) und der Zahl der Plasmid-Kopien
pro Zelle

Der Nachweis, daß das 1 770 bp-Fragment von R388 das Strukturgen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase trägt, ergibt sich aus dem Vergleich der Mengen des resistenten Enzyms aus Zellen mit dem ursprünglichen R-Faktor R388 und dem hybriden Plasmid pWZ820. Wie in Abb.21 gezeigt wird, lassen sich das Trimethoprim-sensitive Wirtsenzym und das Trimethoprim-resistente

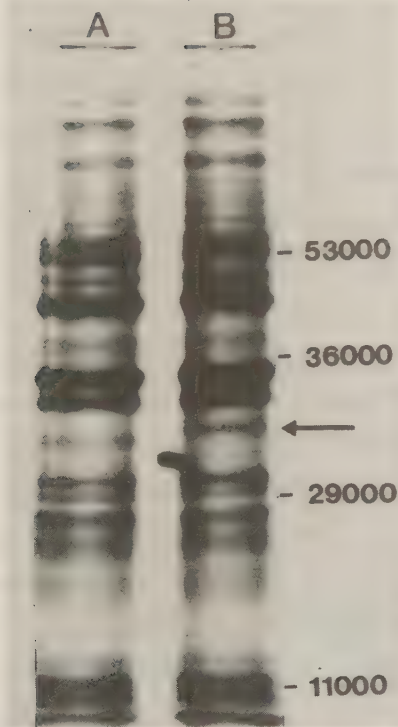


Abb.20: Autoradiogramm von [^{14}C]-marklierten Proteinen, die in Plasmid-haltigen, isolierten Minizellen synthetisiert werden

A: Minizellen mit pBR322

B: Minizellen mit pWZ820; der Pfeil markiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 31 000, das in B zusätzlich auftritt.

E.coli P678-54 wurde mit pBR322 und pWZ820 transformiert und die Minizellen aus 500 ml Kulturen (stationäre Phase, L-Medium) wie in Ref.42 isoliert. Dem zweiten Saccharosegradienten wurde ein Penicillin-Reinigungsschritt vorgeschaltet (44). Die isolierten Minizellen wurden in Minimalmedium (36), ohne Hefehydrolysat, dem 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ derjenigen Aminosäure zugesetzt waren, die in dem [^{14}C]-Gemisch fehlten (Met, His, Asp, Glu, Cys, Trp) suspendiert (0,4 A₅₃₀-Einheiten/ml). 1 ml dieser Suspension wurde 10 Min. bei 37°C vorinkubiert, ehe 10 μCi eines [^{14}C] Aminosäuregemisches (50 mCi/mMol, Amersham) zugesetzt wurden. Nach Inkubation (70 Min., 37°C) wurden die Minizellen lysiert (45) und 40 μl des Überstandes (2×10^4 Impulse/Min.)

auf 11% SDS-Acrylamidgele (14x14x0,1 cm) (Ref.46) aufgetragen. Nach 16 Std. bei 3 V/cm wurden die nicht marklierten Eichproteine mit den Molekulargewichten 53 000 (Glutamatdehydrogenase), 29 000 (Carboanhydrase) und 11 000 (Cytochrom C) mit einem Eisessig-Brillantblau G-250-Gemisch für 30 Min. angefärbt, bevor das Gel - wie in Ref.47 beschrieben - vorbehandelt, getrocknet und für 10 Tage bei -80°C mit Kodak XR-Film exponiert wurde.

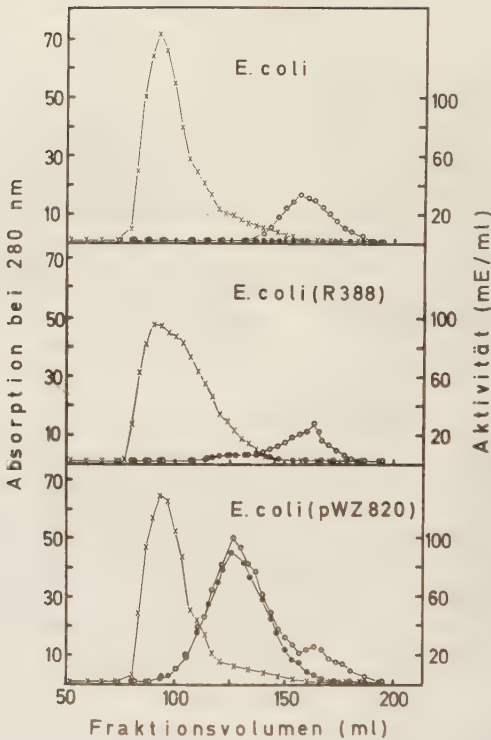


Abb.21: Gel Filtration der Dihydrofolatreduktase von *E.coli* C (oberer Bildteil), *E.coli*114 (R388) (Bildmitte) und *E.coli* C (pWZ820) (unterer Bildteil)

3 l Kulturen von *E.coli* C, *E.coli*114 (R388) und *E.coli* C (pWZ820) wurden in L-Medium (4.2.) bis zu einer Zelldichte von 5×10^8 Zellen/ml angezogen. Die beschallten Zellen wurden für 30 Min. bei 100 000xg zentrifugiert und der Überstand auf Sephadex G75-Säulen (3,5x45 cm) aufgetragen. Die Säulen wurden mit einem Puffer, der 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol und 1 mM EDTA enthielt, eluiert und 4 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden bei 280 nm gemessen (-x-x-) und die Dihydrofolatreduktase-Aktivität in Abwesenheit (-o-o-) und in Gegenwart (-●-●-) von $1 \mu\text{M}$ Trimethoprim bestimmt. Dieser Versuch und der Vergleich der Enzymspiegel in Tab.4 wurden von Frau Ch.Graf durchgeführt.

Plasmidenzym auf einer Sephadex G75-Säule voneinander trennen. Während E.coli-Zellen ohne Plasmid keine Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase enthalten (Abb.21, obere Bildhälfte), ist die Menge dieses Enzyms in Zellen mit pWZ820 (untere Bildhälfte) um einen Faktor 25 gesteigert gegenüber E.coli-Zellen, die das Ausgangsplasmid R388 (Abb.21, Bildmitte) enthalten. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Tatsache, daß R388 nur in wenigen Kopien/Zelle (2.1.2.), pWZ820 aber in mehreren Kopien/Zelle vorliegt, legte die Vermutung nahe, daß die Ursache für die unterschiedlichen Enzymmengen auf die unterschiedliche Kopienzahl zurückzuführen war. Deshalb wurde die Zahl der Plasmidmoleküle in logarithmisch wachsenden Zellen bestimmt, indem die DNA von E.coli (R388) und E.coli (pWZ820) mit [^3H]Thymidin markiert und die Gesamt-DNA nach Scheren in CsCl-Dichtegradienten in Gegenwart von Äthidiumbromid zentrifugiert wurde (Abb. 22). Die Kopienzahl pro Chromosom ergibt sich aus dem untenstehenden Verhältnis (Ref.28)

$$\frac{\text{Radioaktivität des Plasmids}}{\text{Radioaktivität von } \underline{\text{E.coli}}}} \times \frac{2 \times 10^9 \text{ (Molekulargewicht von } \underline{\text{E.coli}})}{\text{Molekulargewicht des Plasmids}}$$

Sowohl das 1 770 bp-Fragment als auch die Menge an Dihydrofolatreduktase sind in Zellen mit pWZ820 um den Faktor 25 erhöht, im Vergleich zu Zellen mit R388 (Abb.21, 22 und Tab.4). Diese Korrelation beweist, daß auf dem 1 770 bp-Fragment die Strukturgen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase liegt.

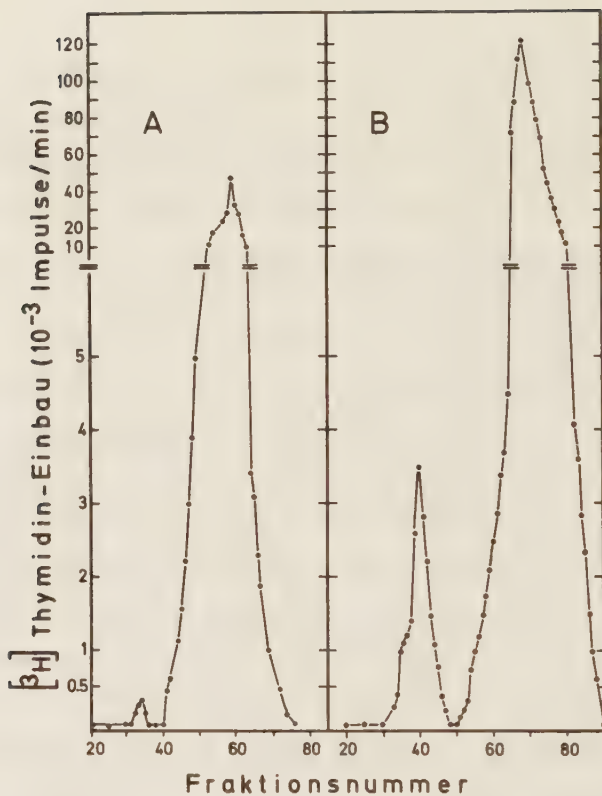


Abb.22: $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbau in die DNA von E.coli 1114 (R388) (A) und E.coli C (pWZ820) (B). (Vgl. 4.4.4.)

Tabelle 4: Vergleich der Menge an Dihydrofolatreduktase (mE/ml) und der Zahl der Plasmidkopien pro Zelle

Stamm	Kopien/ Zelle	Trimethoprim- resistentes Plasmid-Enzym ^a	Trimethoprim- sensitives Wirts-Enzym
<u>E.coli</u>	-	-	607
<u>E.coli</u> (R388)	1,9	70	505
<u>E.coli</u> (pWZ820)	46	1 760	683
Verhältnis 820:388	24	25	-

^a Enzymaktivität in Gegenwart von 1 μ M Trimethoprim/ml

2.4. Charakterisierung der Plasmid-codierten Dihydrofolatreduktase und Vergleich mit dem E.coli-Enzym

Wie in Abb.21 gezeigt wurde, ist es möglich, durch Sephadex G75-Chromatographie die Dihydrofolatreduktase von E.coli und E.coli (R388) bzw. E.coli (pWZ820) von der Hauptmenge der Zellproteine abzutrennen. In einigen Fraktionen der Sephadex-Säule ist jeweils eine der beiden Dihydrofolatreduktasen stark angereichert. Somit war es möglich, das Wirts-Enzym mit den Trimethoprim-resistenten Plasmid-codierten Enzymen von R388 und pWZ820 zu vergleichen.

2.4.1. Hemmung der Enzyme durch Trimethoprim und Methotrexat

Wie aus früheren Arbeiten bekannt war (16,48), ist das R388-codierte Enzym gegen Trimethoprim und Methotrexat resistent. Sowohl im Rohextrakt als auch mit weiter gereinigten Präparationen (4.12.) wurde die Enzymaktivität in Gegenwart von steigenden Mengen der Inhibitoren gemessen. Dabei zeigte sich, daß sowohl das von R388-, als auch das pWZ820-codierte Enzym $>90\%$ ihrer Aktivität in Gegenwart von 1×10^{-4} M Trimethoprim bzw. $0,8 \times 10^{-4}$ M Methotrexat besaßen (höhere Inhibitorkonzentrationen konnten nicht eingesetzt werden, da der optische Test zur Aktivitätsmessung dadurch gestört war). Dies zeigt, daß das R388-Enzym im gleichen Ausmaß resistent gegen Trimethoprim und Methotrexat ist, wie das von pWZ820 codierte Enzym. Die Dihydrofolatreduktase von E.coli hingegen wird in Gegenwart von 1×10^{-6} M Trimethoprim völlig gehemmt.

2.4.2. Messung der Dihydrofolatreduktase-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen und in Gegenwart von SDS und Harnstoff

Die Inkubation der Überstände der hochtourigen Zentrifugation für 10 Min. bei 40°C , 50°C , 60°C und 100°C zeigte, daß von 40°C bis 60°C die Plasmid-codierte Dihydrofolatreduktase 80% ihrer Aktivität bei 37°C verlor, der Wert bei 100°C aber identisch war mit der Ausgangsaktivität. Mit G75-Fractionen (Abb.21) wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Möglicherweise wird bei 100°C eine Pro-

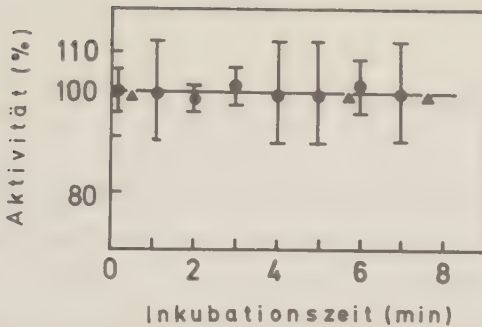


Abb.23 Aktivität der Plasmid-codierten Dihydrofolatreduktase nach Inkubation bei 60°C

- (●) pWZ820-codiertes Enzym
- (▲) R388-codiertes Enzym

Die Reinigung des Plasmid-codierten Enzyms ist in Abschnitt 4.12. beschrieben. 10 mE/ml des gereinigten Enzyms wurden für 10 Min. bei 37°C inkubiert in einem Puffer, der 0,75 mM NADPH, 1 mM 2-Mercaptoäthanol und 0,1 mg Rinderalbumin/ml enthielt. Danach wurden die Proben in ein Wasserbad von 60°C transferiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und in Eis abgekühlt. Die Dihydrofolatreduktase-Aktivität wurde wie angegeben (4.12.) gemessen.

tease inaktiviert, die auch bei der Sephadex-Chromatographie von der Dihydrofolatreduktase abgetrennt wird. Die Enzymaktivität in den angereicherten Fraktionen des R388-codierten Enzyms (Abb.23▲) und des pWZ820-codierten Enzyms (Abb.23 ●) blieb bei Inkubation für 20 Min. bei 60°C und bei 100°C im Gegensatz zu dem E.coli-Enzym voll erhalten. Die Stabilität des Plasmid-codierten Enzyms bei 100°C wurde in der Folgezeit zur Reinigung

des Enzyms herangezogen (4.12.).

Neben dieser bemerkenswerten Temperaturstabilität zeichnet sich das Plasmid-codierte Enzym noch durch eine Reihe weiterer Eigenschaften aus. Nach Zusatz von 6 M Harnstoff zu den vereinigten Fraktionen der Sephadex G75-Säulen (Abb.21) und anschließender Verdünnung des Enzyms oder Entfernung des Harnstoffs mittels Dialyse, bleiben 90% der Aktivität erhalten. Die Aktivität der Plasmid-codierten Dihydrofolatreduktase geht ebenfalls nicht verloren, wenn das Enzym auf 100°C in Gegenwart von 2% SDS erhitzt wird. Nach SDS-Gelelektrophorese und teilweiser Entfernung des SDS durch Schwenken der Gele für 2-3 Std. in H₂O reicht die Aktivität des Enzyms aus, um eine positive Farbreaktion mit Tetrazoliumbromid (51) zu geben. Das Verhalten der Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase gegenüber SDS erlaubt es somit, nach SDS-Gelelektrophorese das aktive Enzym auf den Gelen zu lokalisieren. Ebenso problemlos ist die Aufbewahrung des Enzyms, da es sich ohne Aktivitätsverlust lyophilisieren läßt.

3. DISKUSSION

3.1. Isolierung und Charakterisierung von R388-DNA

Der R-Faktor R388 zeichnet sich durch einige bemerkenswerte Eigenschaften aus. Obwohl bei der Isolierung von [^3H] Thymidin-markierter R388-DNA im analytischem Maßstab Plasmid-DNA in der superhelikalen Konformation nachgewiesen werden konnte, war es im präparativen Maßstab nicht möglich, ausreichende Mengen dieser DNA zu isolieren. Um die Gradienten nicht zu überladen und um eine vollständige Abtrennung der Plasmid- von der Wirts-DNA zu erreichen, war es notwendig, die DNA in den klaren Lysaten vor der Zentrifugation vorzureinigen und zu konzentrieren. Die Proteine wurden mit Proteinase K abgebaut und die RNA auf Hydroxyapatit-Säulen abgetrennt. In den so vorbehandelten Proben lag nur noch ein geringer Teil der Plasmid-DNA in der superhelikalen Form vor. Da bei anderen Plasmiden gezeigt wurde, daß der Verlust dieser Konformation auf den Abbau eines Relaxationsproteins zurückzuführen war (52), liegt der Verdacht nahe, daß der R-Faktor R388 ebenfalls als Relaxations-Komplex in der Zelle vorliegt.

Im Gegensatz zu anderen Plasmiden konnte eine Dissoziation von R388 in einen Transferteil und R-Determinanten nach Transfer von

R388 aus E.coli in P.mirabilis nicht beobachtet werden (53). Beim Vergleich von R388-DNA aus E.coli mit der R388-DNA aus P.mirabilis traten in der analytischen Ultrazentrifuge die für die Dissoziation charakteristischen Banden mit einer intermediären Schwimmdichte nicht auf. Von anderen Autoren wurde gezeigt, daß die Dissoziation von R-Faktoren auf IS-Sequenzen am Ende der R-Determinanten zurückzuführen ist (54,55). Das legte die Vermutung nahe, daß das Trimethoprim-Resistenzgen von R388 nicht von IS-Sequenzen flankiert ist. Solche IS-Sequenzen wurden aber an den Enden der Trimethoprim-Resistenzgene der R-Faktoren R483 und R751 eindeutig nachgewiesen (56,57).

Obwohl keine Dissoziation von R388 beobachtet wurde, führte der Transfer dieses R-Faktors von E.coli in P.mirabilis zu einer Umstrukturierung der DNA. Der Vergleich der Restriktionsmuster von R388 und R388^{*} zeigte, daß sowohl R388-DNA deletiert, als auch neue, zuvor nicht in R388 vorhandene DNA inseriert wurde. Die Fähigkeit von Plasmiden, DNA in vivo zu verlieren oder neu aufzunehmen, ist ein verbreiteter Mechanismus, der wesentlich zur Diversität von Plasmiden beiträgt (39).

3.2. Deletion von R388-DNA

Der R-Faktor R388 ist zur Lokalisation des Trimethoprim-Resistenzgens besonders gut geeignet, da er neben der Trimethoprim-Resistenz noch zwei weitere, phänotypisch testbare Funktionen besitzt, die deletiert werden können. Es handelt sich dabei um die Resistenz gegen Sulfonamide und die Fähigkeit, sich selbst zu übertragen. Das kleinste Deletionsplasmid pWZ11 (7 100 bp) kann aufgrund seiner geringen Größe in Vektoren eingebaut werden, die sich amplifizieren lassen (z.B. pSF2124, Ref.28). Dadurch können große Mengen der eingebauten R388-DNA isoliert, mit Restriktionsnukleasen kartiert und Teile davon gezielt deletiert werden.

3.3. Zuordnung von Funktionen zu bestimmten Restriktionsfragmenten von pWZ61

Die Kenntnis der Lage der Spaltstellen auf der pWZ61-DNA, dem hybriden Plasmid aus pWZ11 und dem Vektor pSF2124, erlaubt es, bestimmten Restriktionsfragmenten bestimmte Funktionen zuzuordnen. Die Lage der Spaltstellen für sechs Restriktionsnukleasen stimmt - was den pSF2124-Teil von pWZ61 betrifft - mit den zwischenzeitlich veröffentlichten Restriktionskarten des ColE1-Faktors (32) und der Tn3-Sequenz (33) im wesentlichen überein. Auch die Insertionsstelle der Tn3-Sequenz in den ColE1-Faktor (34) ist

im Einklang mit der in Abb.10 angegebenen Position. Jedoch wurden im pSF2124-Teil von pWZ61 zwei Fragmente von 130 bp und 80 bp gefunden (Fragment 21 und 30 in Abb.10), die von anderen Autoren (33,34) nicht beschrieben wurden. Eine Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden, zumal in der Restriktionskarte des Tn3-Transposons (Ref.33) die IS-Sequenzen von 140 bp angegeben sind. Auch liegt die für das HaeII-Fragment B des ColE1-Faktors angegebene Länge (60) um 8% über dem Wert, der in Tabelle 2 für das entsprechende Fragment 34-35 angegeben wird. Eine mögliche Erklärung liegt in den unterschiedlichen Molekulargewichtsstandards, die zur Eichung benutzt wurden. Während die HaeII-Fragmente von ColE1 in Ref.60 mit EcoRI-gespaltener λ -DNA geeicht sind, wurden die gleichen Fragmente in Ref.32 in Prozent der Gesamtlänge des ColE1-Faktors angegeben, wobei für den ColE1-Faktor ein Molekulargewicht von $4,2 \times 10^6$ zugrunde gelegt wird.

Den in der physikalischen Karte von pWZ61 in Abb.10 angegebenen Restriktionsfragmenten konnten folgende Funktionen zugeordnet werden:

1. Die Ampicillin-Resistenz aus dem Tn3-Teil von pSF2124 (eingerahmter Bereich in Abb.10) liegt auf den Fragmenten 28-30, da in pWZ74 die restlichen Fragmente der Tn3-Sequenz deletiert sind (19-27), ohne daß die Expression der Ampicillin-Resistenz beeinträchtigt wird.
2. Die Lage der Immunitätsregion konnte durch Vergleich von pWZ74,

pWZ94 und pWZ703 ermittelt werden. In pWZ74 sind durch die BamH1-Deletion die Fragmente 17-27 nicht mehr vorhanden und die Zellen mit pWZ74 sind sensitiv gegen ColicinE1. Zellen mit pWZ94 bzw. pWZ703 dagegen sind resistent gegen dieses Bakteriocin. Während pWZ94 die Fragmente 17-27 vollständig enthält, sind in pWZ703 aus dieser Region nur noch die Fragmente 17,18 und Teile des Fragmentes 19 vorhanden. Also müssen die Gene für die ColicinE1-Immunität diesem Bereich von pWZ61 zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren (34,60, 61), die die Immunitätsregion in den ColE1-Teil lokalisieren, der dem Fragment 17 in Abb.10 entspricht.

3. Die Motilitätsgene des ColE1-Faktors erstrecken sich über die Fragmente 31-35 in Abb.10 (Ref.34).

4. Auf dem HaeII-Fragment 18 liegt der inzwischen sequenzierte Replikationsstartpunkt des ColE1-Faktors (Ref.58).

Diese Zuordnung erklärt auch die wiederholt negativen Versuche, das größte BamH1-Fragment (28-3) von pWZ61 zu zirkularisieren und ColE1-sensitive, Trimethoprim- und Ampicillin-resistente Plasmide zu isolieren (2.2.5.). Zum Zeitpunkt der Versuche war bekannt, daß der Replikationsstartpunkt des ColE1-Faktors 18% der ColE1-Gesamtlänge von der EcoRI-Spaltstelle entfernt liegt (Ref.30).

Aus der Tatsache, daß nach Amplifizierung mit Chloramphenicol die Ausbeute an pWZ74-DNA und pWZ94-DNA erheblich über der Ausbeute an R388-DNA lag und allen drei Plasmiden nur das größte BamH1-Fragment gemeinsam war (28-3), wurde geschlossen, daß der Repli-

kationsstartpunkt des ColE1-Faktors auf den Fragmenten 34-35 liegt. Da diese Zuordnung nicht zutreffend ist (siehe Punkt 4), konnten infolgedessen bei den gewählten Selektionsbedingungen keine lebensfähigen Plasmide bei der Zirkularisation des BamH1-Fragmentes erfaßt werden.

Obwohl die DNA-Ausbeute von pWZ74 und pWZ94 über der von R388 liegt, beginnt die Vermehrung beider Plasmide an unterschiedlichen Replikationsstartpunkten. pWZ61 besitzt neben dem ColE1-Replikationsstartpunkt in Fragment 18 (Abb.10) noch den Replikationsstartpunkt von R388 im pWZ11-Teil. Dem Deletionsplasmid pWZ74 (Abb.10, innerer Kreis) fehlt das Fragment 18, die Replikation kann folglich nicht mehr am ColE1-Replikationsstartpunkt beginnen. Demgegenüber ist in pWZ94 der pSF2124-Teil von pWZ61 ungeschädigt enthalten. Auf die unterschiedliche Kontrolle der Replikation von pWZ74 im Vergleich zu pWZ94 deuten auch die DNA-Ausbeuten hin, die bei der präparativen Isolierung der beiden Plasmide erhalten wurden. Die Menge an pWZ74-DNA beträgt nur 20% der DNA-Menge, die aus vergleichbaren Aufarbeitungen mit pWZ94 isoliert werden konnte. Das deutet darauf hin, daß sich pWZ74 - wie der R-Faktor R388 - nicht mit Chloramphenicol amplifizieren läßt. Eine endgültige Abklärung des Replikationsmechanismus von pWZ74 muß in Versuchen erfolgen, wie sie zur Aufklärung der Replikation des ColE1-pSC101-Hybrids unternommen wurden (62).

3.4. Lokalisierung des Trimethoprim-Resistenzgens

Die Analyse der rekombinanten Plasmide pWZ61, pWZ74, pWZ94, pWZ651, pWZ820 und pWZ830 zeigt, daß das Trimethoprim-Resistenzgen dem EcoRI/BamHI-Fragment von 1 770 bp zugeordnet werden kann (Fragment 1-3 in Abb.10). Alle Plasmide, die diese R388-Sequenz enthalten, ermöglichen es den Wirtszellen, in Gegenwart von 1 mg Trimethoprim/ml zu wachsen. Da in pWZ820 als einziger R388-Teil das 1 770 bp-Fragment enthalten ist, muß auf diesem Fragment das gesuchte Resistenzgen liegen.

Bei der Dimerisierung des 1 770 bp-Fragmentes wurden nach Insertion eines Kopf-Kopf-Dimeren in die EcoRI-Spaltstelle von pSF2124 (2.2.6.) nie eine R388-Sequenz von 3 540 bp gefunden. Vielmehr wurden Deletionsmutanten isoliert, bei denen zumindest Teile eines Monomeren deletiert waren (pWZ651). Echte Palindrome, wie sie bei der beschriebenen Dimerisierung gebildet werden, scheinen in E.coli nicht stabil zu sein. Diese Beobachtung ist in Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren (59), die bei Versuchen in einem anderen System ebenfalls keine intakten Palindrome gefunden haben. Die Insertion von Kopf-Kopf-Dimeren scheint ein geeignetes Mittel, um Deletionen in die DNA einzuführen. Mit Hilfe dieser "Dimer-induzierten" Deletionen sollte es möglich sein, kleinere Stücke zu isolieren, die immer noch das funktionsfähige Gen enthalten. In pWZ703 (Abb.17) umfaßte die "Dimer-induzierte" Deletion ein Mono-

mer vollständig und Teile des zweiten Monomeren. Die dem BamHI-Ende des 1 770 bp-Fragmentes benachbarten Sequenzen von 530 bp fehlten in pWZ703. Daraus folgt, daß zur Expression der Trimethoprim-Resistenz nur die 1 240 bp notwendig sind, die dem EcoRI-Ende benachbart sind. Diese DNA-Größe ist sicher ausreichend für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 000, wie es für die Plasmid-codierte Dihydrofolatreduktase von R388 angegeben ist (Ref.16,48).

3.5. Nachweis des Strukturgens der Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase auf dem 1 770 bp-Fragment

Der Nachweis des Strukturgens auf dem 1 770 bp-Fragment gelang durch den Vergleich der Anzahl der Plasmidkopien pro Zelle und dem Enzymspiegel (Tab.4). Eine solche Korrelation zwischen der Zahl der Genkopien und des Genproduktes wurde für mehrere Prokaryonten-Gene beobachtet (z.B. Tab.3 in Ref.14). Die im Ergebnisteil beschriebenen Versuche, mit Hilfe der in Minizellen exprimierten Proteine zu zeigen, daß das Strukturgens für die Dihydrofolatreduktase auf dem 1 770 bp-Fragment liegt, bedürfen einiger Erläuterungen. Gesucht wurde ein Protein, das auf SDS-Gelen wie ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 000 wandert. Diese Größe wurde von anderen Autoren (16,48) auf Sephadex G75-Säulen für die R388-codierte Dihydrofolatreduktase bestimmt. Wie sich

im Laufe der Versuche herausstellte, hat eines der von pBR322 codierten Proteine ein Molekulargewicht von 35 000 (Ref.36). Ein zusätzliches Protein dieser Größe, das in Minizellen mit pWZ820 synthetisiert wird, ist deshalb nur schwer nachzuweisen (Abb.20). Um eine Überlappung von Vektor-codierten Proteinen und der neu synthetisierten Dihydrofolatreduktase auszuschalten, wurden Proteine, die von pWZ830 codiert werden, mit den Proteinen, die von pAC105 synthetisiert werden, verglichen (siehe Übersicht Abb.18b). Die von dem Vektor pAC105 codierten Proteine liegen nicht in dem zu untersuchenden Größenbereich. Auch auf diesen Autoradiogrammen fand sich kein Protein der Größe der Dihydrofolatreduktase. Möglicherweise ist die Menge der in Minizellen exprimierten Dihydrofolatreduktase zu gering, um sie nach Markierung auf Autoradiogrammen nachzuweisen. Es ist auch nicht auszuschließen, daß Untersuchungen mit dem gereinigten Enzym zu Ergebnissen führen, die es erfordern, die Autoradiogramme einer nochmaligen Prüfung zu unterziehen. Dafür spricht der Befund, daß in den angereicherten Enzympräparationen (4.12.) auf SDS-Gelen kein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 000 zu finden war.

3.6. Die Regulation des Dihydrofolatreduktase-Gens des R-Faktors R388

Da die Nukleotidsequenzen außerhalb des EcoRI- und BamHI-Endes des 1 770 bp-Fragmentes in verschiedenen Plasmiden unterschiedlich sind, kann man die Lage des Promotors des Dihydrofolatreduktase-Gens eingrenzen.

Hinsichtlich des EcoRI-Endes sind die Plasmide pWZ11, pWZ61 und pWZ703 zu vergleichen (Übersicht in Abb.18a und 18b). In Nachbarschaft der EcoRI-Spaltstelle liegen in pWZ11 Sequenzen, die aus R388 stammen, während in pWZ61 dieser Spaltstelle ColE1-Sequenzen benachbart sind (Fragmente 31-37 in Abb.10). In pWZ703 sind zwar ebenfalls ColE1-Sequenzen der EcoRI-Spaltstelle benachbart, aber es handelt sich hierbei um die Fragmente 16-18 in Abb.10 (vgl. auch Abb.17). Im Falle von pWZ61 könnte man annehmen, daß die Transkription von dem ColicinE1-Promotor (Fragment 34 in Abb. 10; Ref.34) beginnt und für die Expression des Gens auf dem 1 770 bp-Fragment verantwortlich ist. Dieser Annahme steht aber die Tatsache entgegen, daß in pWZ703 dieser Promotor fehlt und trotzdem die gleiche hohe Trimethoprim-Resistenz wie bei pWZ61 vorhanden ist.

Hinsichtlich des BamHI-Endes des 1 770 bp-Fragmentes sind die Plasmide pWZ11, pWZ94, pWZ651 und pWZ820 miteinander zu verglei-

chen (vgl. Übersicht in Abb.18a und 18b). Dem BamH1-Ende sind in pWZ11 die R388-Sequenzen 4-13 in Abb.10, in pWZ94 aber die R388-Sequenzen 14-16 in Abb.10 und in pWZ651 die Fragmente 3-1 (Kopf-Kopf-Dimer) benachbart. In pWZ820 sind dem BamH1-Ende Sequenzen von pBR322 benachbart. Da der Promotor des Dihydrofolatreduktase-Gens weder außerhalb der EcoRI-Spaltstelle, noch außerhalb der BamH1-Spaltstelle liegt, befindet er sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem 1 770 bp-Fragment.

Zwei Befunde geben Hinweise auf die Regulation der Dihydrofolatreduktase (Tabelle 4):

1. Die Korrelation zwischen der Zahl der Genkopien pro Zelle und dem Enzymspiegel läßt vermuten, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen ohne Repressor-Kontrolle und ohne Rückkoppelung durch die Menge an schon vorhandenem Enzym kontinuierlich exprimiert wird.
2. Offenichtlich wird das E.coli-Enzym überproduziert, was ebenfalls auf eine Repressor-unabhängige Kontrolle hindeutet. Die Überproduktion drückt sich in einer unveränderten Wachstumsrate von E.coli (R388) in Gegenwart von 1 mg Trimethoprim/ml aus. Unter diesen Bedingungen sind 85% der gesamten intrazellulären Dihydrofolatreduktase-Aktivität gehemmt. Nur noch das R388-induzierte Enzym (15% der Gesamtaktivität) ermöglicht den Zellen das Wachstum in Gegenwart des Inhibitors (Tab.4). Daraus könnte man schließen, daß E.coli-Zellen auch in Abwesenheit von etwa 85% der gebildeten Dihydrofolatreduktase wachsen können. Eine solche Über-

produktion wurde in E.coli-Zellen (J.T. Smith, persönliche Mitteilung und Ref.10 und 50) und in Zellen von Eukaryonten (49) nachgewiesen.

3.7. Ausblick

Mit dem 1 770 bp-Fragment steht ein DNA-Fragment zur Verfügung, das es ermöglicht, die molekulare Struktur eines Dihydrofolatreduktase-Gens und dessen Regulationsmechanismus aufzuklären. Diese Untersuchungen könnten durch eine weitere Verkleinerung des 1 770 bp-Fragmentes erleichtert werden. Eine Möglichkeit der weiteren Eingrenzung des Dihydrofolatreduktase-Gens besteht in der Anwendung der beschriebenen "Dimer-induzierten" Deletionen, wobei die Selektion der Transformanten auf Trimethoprim-Resistenz gewährleistet, daß das Strukturgen ungeschädigt vorhanden ist. Das so erhaltene "Minimalfragment" ließe sich dann mit Restriktionsnukleasen weiter kartieren und auch sequenzieren. Da auch eine zumindest teilweise Sequenzierung des Enzyms im Bereich des möglichen liegt, könnte man eine Zuordnung der Nukleotidsequenzen und der Proteinsequenzen erreichen. Auch der Promotor, der durch RNA-Polymerase-Bindungsstudien zu definieren ist, könnte dann sequenziert werden.

Es ist weiterhin möglich, das Strukturgen durch Anwendung der

Techniken zur in vitro Neukombination von DNA an einen starken Promotor (z.B. Lac-Promotor) zu koppeln und die Expression dieser neu geschaffenen Einheit in vivo zu untersuchen. Es ist auch denkbar, das Gen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase in eukaryontische Vektoren (z.B. Polyoma-Virus) einzubauen und dann in höhere Zellen hineinzubringen. Die Temperaturstabilität des Plasmid-codierten Enzyms würde es erlauben, die möglicherweise stattfindende Expression des Prokaryonten-Gens in der eukaryontischen Zelle eindeutig nachzuweisen. Damit könnte die Kompatibilität von pro- und eukaryontischer Transkription, Translation und Regulation untersucht werden.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1 Reagenzien

Acrylamid, Actinomycin D, Brij-58, Lysozym, 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin, Streptomycinsulfat, Sulfathiazol und Triton X100 waren Produkte der Firma Serva, Heidelberg. Trimethoprim (2,4-diamino-5-[3,4,5-trimethylbenzyl]-Pyrimidin) war ein Geschenk der Deutschen Wellcome, Grossburgwedel und von Hoffmann-LaRoche, Basel. Später wurde es wie Ribonuklease A (Typ IA) und Mitomycin C von Sigma GmbH, München, bezogen. Tetracyclin-HCl (Achromycin) wurde von Cyanamid, Wolfratshausen, Ampicillin (Biototal) von Bayer AG, Leverkusen, Penicillin G (Natriumsalz) von Heyl, Berlin, Chloramphenicol und NADPH von Boehringer, Mannheim und Proteinase K von E. Merck, Darmstadt, geliefert. SeaKem Agarose war ein Produkt der Marine Colloids, Inc., Rockland, Maine. Dihydrofolat wurde nach Ref.⁶⁴ hergestellt.

4.2 Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurde L-Medium (65) als komplexes Medium und M9-Medium (65), dem 0,2% Glucose, 0,1% Caseinhydrolysat und 1 µg Thiamin-HCl/ml zugesetzt wurden, als Minimalmedium verwendet. Je nach Experiment wurde diesen beiden Medien einer oder mehrere der folgenden Hemmstoffe zugesetzt: Trimethoprim (1 mg/ml), Sulfathiazol (500 µg/ml), Tetracyclin-HCl (100 µg/ml), Ampicillin (50 µg/ml), Streptomycinsulfat (200 µg/ml oder Colicin E1 (100 Einheiten/ml). Colicin E1 wurde nach Ref.⁶³ isoliert. Zur Differenzierung von E.coli von P.mirabilis wurde der Harnstoff-Agar nach "Christensen" (E. Merck, Darmstadt) und zur Markierung der Proteine in Minizellen mit [³⁵S]Methionin das "Methionine Assay-Medium" (Difco, Detroit, Michigan, USA) benutzt.

4.3 Bakterienstämme und Plasmide

E.coli JC7623 strA (66) und E.coli P678-54 minA, minB, strA (67) wurden von H. Saedler erhalten. E.coli YS40 (68) (von J. Messing) wurde als Indikatorstamm für die Colicin E1-Produktion verwendet. In E.coli C (von W. Goebel) wurden die ColE1-Derivate vermehrt. Aus Haemophilus parainfluenzae (von H. Schaller) wurden die beiden Restriktionsenzyme HpaI und HpaII isoliert. Als Dihydrofolatreduktase-überproduzierende Mutante wurde E.coli AB2463 (10) (von K.A. Stacey) benutzt. P.mirabilis war ein kli-

nisches Isolat⁷ (Kinderklinik München).

R388 Tp,Su,Tra (18) wurde als Plasmid in E.coli 114 von J.T. Smith erhalten. Es trägt das Gen für eine Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase (16). pSP2124 Ap,Ce1,Ice1 (28) (von D.J. Thomas), pBR322 Ap,Tc (37) (von H. Boyer) und pAC 105 Ice1 (43) (von A. Markovitz) wurden als Vektoren benutzt. In sie wurden Teile des R-Faktors R388 durch in vitro Rekombination eingebaut. Die Eigenschaften dieser Hybrid-Plasmide und der von R388 abgeleiteten Deletionsplasmide R388* und pWZ11, sind in Abschnitt 4.11. beschrieben. Die Abkürzungen für die Plasmid-Marker entsprechen denen in Ref.69 (vgl. Abkürzungsverzeichnis).

4.4 Desoxyribonukleinsäuren

4.4.1. Präparative Isolierung von R388- und R388*-DNA

10 l L-Medium wurden mit 500 ml einer stationären Kultur von E. coli 114 (R388) oder P.mirabilis (R388*) angeimpft und unter starker Belüftung bei 37°C angezogen. Bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^9$ /ml wurden die Zellen abzentrifugiert. Daraus wurde die Plasmid-DNA ähnlich wie in Ref.70 isoliert. Dazu wurde bei 0°C 1/6 der Zellmasse in 40 ml einer Mischung aus 10 mM Tris-HCl, pH 8,2, 20% Saccharose (w/v), 10 mM Na₂N₃ und 100 mM NaCl suspendiert. Danach wurden 8 ml einer frisch bereiteten Lysozym-Lösung (4 mg/ml in 120 mM Tris-HCl, pH 8,2, 50 mM EDTA) zugegeben und die entstandenen Sphäroblasten nach 90 Sek. durch Hinzufügen von 50 ml einer Mischung aus 1% Brij-58 (w/v) und 0,4% Natriumdesoxycholat (w/v) in 2 M NaCl und 10 mM EDTA vollständig lysiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 50 µg/ml) wurde die hochviskose Lösung in einem 1 l Kolben vorsichtig für 10 Min. bei 25°C geschwenkt. Die Wirts-DNA wurde abzentrifugiert (Spinco Rotor Ti 42, 30 Min., 0°C, 30 000 Upm). Sechs solcher Zentrifugenüberstände wurden vereinigt (500 ml), gegen 10 l 10 mM Kaliumphosphat, pH 6,8 dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Lösung auf eine Hydroxyapatit-Säule (hergestellt nach Ref.71, 6x5 cm) aufgezogen, die zuvor mit dem Dialysepuffer äquilibriert worden war. Nach dem Waschen der Säule mit 500 ml Dialysepuffer wurde die Phosphatkonzentration auf 150 mM erhöht (Abtrennung der RNA) und danach die DNA mit 350 mM Phosphat eluiert. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit H₂O auf 50 µg/ml verdünnt und gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl und 5 mM EDTA dialysiert. Festes CsCl wurde solange zugegeben, bis die Lösung eine Dichte von 1,700 g/ml (Brechungsindex 1,3994) aufwies. Aliquots von 7 ml wurden für 60 Std. bei 15°C und 40 000 Upm in Cellulosenitrat-Röhrchen im Spinco Rotor Ti 50 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen

von unten mit einer Nadel angestochen und Fraktionen von je 200 μ l gesammelt. Die Fraktionen, in denen das Plasmid angereichert war, wurden vereinigt und unter gleichen Bedingungen rezentrifugiert.

Für die Zentrifugation von R388⁺-DNA in Gegenwart von Actinomycin D (26) wurde die Dichte der DNA-haltigen Lösung durch Zugabe von festem CsCl auf 1,587 g/ml (Brechungsindex 1,3882) eingestellt. Vor der Zugabe von 20 μ g Actinomycin D/ml (1 mg/ml in H₂O) wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt. 7 ml Proben wurden für 4 Std. bei 4°C und 33 000 Upm in einem Spinco Rotor Ti 50 zentrifugiert. Die Plasmid-DNA, die als dünne gelbe Bande oberhalb der Wirts-DNA im durchscheinenden Licht zu sehen war, wurde isoliert und unter gleichen Bedingungen rezentrifugiert. Actinomycin D wurde durch dreimaliges Ausschütteln der Lösung mit CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt, die DNA gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

4.4.2 Präparative Isolierung der DNA von ColE1-Derivaten

Alle ColE1-Derivate (pWZ61, pWZ74, pWZ94, pWZ651, pWZ703, pWZ820, pWZ830, pSF2124, pBR322 und pAC105) wurden in Anlehnung an Ref. 23 und 72 isoliert: 2x500 ml vorgewärmtes L-Medium in 1 l Fernbachkolben wurden mit je 10 ml einer Übernachtskultur der Plasmid-haltigen Stämme angeimpft und 2,5-3 Std. bei 37°C geschüttelt. Bei einer Zelldichte von 2×10^8 /ml wurden 2,5 ml Chloramphenicol (34 mg/ml in Äthanol) zugegeben und die Kulturen 6-14 Std. weiter inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor, 6 000 Upm, 20 Min. 4°C) und in 45 ml einer eiskalten Lösung von 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 25% Saccharose (w/v) suspendiert. In Abständen von 5 Min. wurden bei 0°C 8 ml einer Lysozymlösung (5 mg/ml in H₂O, frisch bereitet), 16 ml einer EDTA-Lösung und 20 ml einer 5 M NaCl-Lösung zugefügt. Die nicht viskose Lösung wurde auf 4 Sorvall SS34 Röhrchen verteilt. Zu jedem Röhrchen wurden 2 ml einer 10% SDS-Lösung durch Ausblasen einer Pipette, die auf den Boden des Zentrifugenröhrchens aufgesetzt war, zugefügt. Die nunmehr hochviskose Lösung wurde für 16 Std. in Eis aufbewahrt. Die Wirts-DNA wurde durch Zentrifugation abgetrennt (Sorvall, SS34-Rotor, 17 000 Upm, 4°C, 20 Min.). Die Saccharosekonzentration im klaren, nicht viskosen Überstand (50 ml) wurde durch Zugabe von H₂O halbiert. Die RNA wurde durch Inkubation mit RNase für 90 Min. bei 37°C abgebaut (RNase aus Pankreas, Worthington, 5 mg/ml in 2 M Na-Acetat, pH 5,5; 10 Min. bei 100°C inkubiert). Die Proteine wurden durch dreimaliges Ausschütteln mit 1 Volumen Phenol (gesättigt mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) extrahiert und das verbliebene Phenol mit CHCl₃ entfernt. Die Plasmid-DNA in der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 2,5 M Na-Acetat, pH 5,5, 2,5

Volumen Äthanol und Aufbewahren der Lösung bei -80°C (30 Min) ausgefällt. Der Niederschlag wurde bei -15°C abzentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor, 9 000 Upm).

Die DNA wurde in 20 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Zur Lösung wurde soviel festes CsCl gegeben, bis die Dichte 1,610 g/ml (Brechungsindex 1,3911) betrug. Äthidiumbromid (10 mg/ml in TE-Puffer) wurde bis zu einer Endkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben, wobei die auftretende Dichteänderung durch Zusatz von festem CsCl korrigiert wurde. Die Trennung von Plasmid- und Wirts-DNA erfolgte durch Zentrifugation in einem Spinco Rotor Ti60 (48 Std., 15°C , 33 000 Upm). Die Plasmid-Bande (untere der beiden Banden) wurde unter Fluoreszenzkontrolle (bei 366 nm) mit einer Pasteur-Pipette isoliert. Das Äthidiumbromid wurde mit einer 1:1 Mischung von Isopropanol und n-Butanol (gesättigt mit 3 M CsCl in TE-Puffer) dreimal extrahiert und die Plasmid-DNA gegen TE-Puffer dialysiert. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Aus 1 l Kulturen wurde 1 mg Plasmid-DNA, die frei von Wirts-DNA war, isoliert.

4.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Einzelkolonien

Um die Plasmid-DNA aus Einzelkolonien zu isolieren, wurde die Lysemethode nach Ref.36 angewandt. Die DNA in dem klaren LySAT wurde mit Äthanol gefällt und der Niederschlag in 100 μl einer Mischung aus 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, und 20 mM MgCl_2 gelöst. Aliquots von 25 μl wurden entweder direkt oder nach Spaltung mit Restriktionsnukleasen auf Agarosegelen aufgetragen.

4.4.4 Markierung der DNA mit $[^3\text{H}]$ Thymidin

Zur Optimierung der Lysebedingungen wurde die DNA von *E.coli* 114 (R388) und *P.mirabilis* (R388*) mit 10 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ Thymidin (27 Ci/Mol; Amersham) wie in Ref.21 markiert und über CsCl-Äthidiumbromid-Gradienten wie in 4.3.1. isoliert. In den ersten Versuchen wurden 10 ml Kulturen, in späteren 30 ml Kulturen markiert. Dazu wurde M9-Medium (4.2.) benutzt, dem 0,5% Caseinhydrolysat (vitaminfrei, E. Merck, Darmstadt) zugesetzt waren.

Die Kopienzahl von R388 in *E.coli* 114 und pWZ820 in *E.coli* C wurde durch Markierung der DNA mit $[^3\text{H}]$ Thymidin bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 10 ml Minimal-Medium nach Vogel-Bonner (73), dem 0,5% Caseinhydrolysat, 0,2% Glucose und 1 μg Thiaminpyrophosphat/ml zugesetzt waren, bis zu einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml angezogen. Nach Zugabe von 10 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ Thymidin wurden die Kulturen bis zu einer Zelldichte von 5×10^8 /ml weiterinkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Sorvall

SS34, 10 000 Upm, 10 Min.), der Niederschlag zweimal mit TES-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) gewaschen und die Zellen wie in Ref.⁷⁴ in 1 ml Gesamtvolumen lysiert. Das hochviskose Lysat wurde wie in Ref.⁷⁵ in Äthidiumbromid-CsCl-Dichtegradienten für 60 Std. bei 33 000 Upm und 15°C (Spinco Rotor Ti50) zentrifugiert. Fraktionen von 80 µl wurden gesammelt (4.4.1.), von denen 30 µl wie in Abb.19 beschrieben auf Filter gefällt und gezählt wurden.

4.4.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt: 1 A₂₆₀-Einheit/ml = 50 µg DNA/ml.

4.5. Transfer von R388

Der R-Faktor R388, der die Fähigkeit besitzt, sich selbst zu übertragen (Tra⁺), wurde von E.coli 1114 durch Ausstreichen auf Agarplatten gegen P.mirabilis oder E.coli JC7623 in diese Stämme übertragen. Die Selektion erfolgte bei P.mirabilis durch Zusatz von Trimethoprim, Sulfathiazol und Tetracyclin-HCl zu den L-Agarplatten und bei E.coli JC7623 durch Zusatz von Trimethoprim, Sulfathiazol und Streptomycinsulfat zu den Minimal-Agarplatten.

4.6. Transformation und Selektion der Transformanten

E.coli C, P.mirabilis und E.coli P678-54 wurden nach Ref.⁷⁶ mit CaCl₂ kompetent gemacht und mit der DNA transformiert. Zur Expression der Antibiotika-Resistenz wurden die Kulturen für 2 Std. bei 37°C in L-Medium inkubiert und anschließend auf L-Agar mit Antibiotika-Zusätzen (4.2.) ausplattiert.

Auf ColicinE1-Immunität (Ice1) wurde entweder durch Ausstreichen der Plasmid-haltigen Stämme gegen E.coli C (pSF 2124) oder durch Zusatz von isoliertem ColicinE1 zu den Kulturen (4.2.) getestet. Die Fähigkeit ColicinE1 zu produzieren (Ce1), wurde geprüft, indem einzelne Transformanten für 16 Std. bei 42°C auf L-Agar inkubiert wurden (ca. 60 Kolonien pro Platte). Die Zellen wurden mit CHCl₃-Dämpfen abgetötet und die Platte mit 4 ml Weichagar (0,7%, w/v) überschichtet, in dem 4x10⁶ Zellen von E.coli YS40 suspendiert waren (Agartemperatur 45°C). Eine Wachstums hemmung der Indi-

katorbakterien (Hemmzonendurchmesser 0,5 cm nach 5-8 Std. bei 37°C) zeigte die Bildung von ColicinE1 durch die Transformatanten an.

4.7. Mutagenese von E.coli114 (R388)

E.coli114 (R388) wurde mit 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin mutagenisiert (65) und Verdünnungen davon auf L-Agar, dem Trimethoprim zugesetzt war, ausgestrichen, sodaß nach Inkubation für 16 Std. bei 28°C etwa 200-300 Kolonien pro Platte zu finden waren (Stammpatte). Diese Kolonien wurden mit einem modifizierten Stempel, bei dem der herkömmliche Samtüberzug durch Stahlstifte ersetzt war, die im Abstand von 1 mm zueinander eingelassen waren, auf 3 Platten (A,B und C) übertragen. Die Platten A und B enthielten Trimethoprim und wurden bei 28°C (A) bzw. bei 42°C (B) inkubiert. Die Platte C, die kein Trimethoprim enthielt, wurde bei 42°C inkubiert und diente als Kontrolle für das fehlerfreie Überstempeln der Kolonien von der Stammpatte und für die Fähigkeit der mutagenisierten Kolonien, in Abwesenheit von Trimethoprim bei 42°C zu wachsen. Die Plasmide in den Kolonien des Phänotyps A⁺, B⁻, C⁺ wurden wie in 4.5. beschrieben in E.coli JC7623 übertragen.

4.8. Restriktionsnukleasen

4.8.1. Isolierung von zwei Restriktionsnukleasen aus Haemophilus parainfluenzae (HpaI^a und HpaII)

Die Isolierung von HpaI und HpaII umfaßte sechs Säulenschritte und erfolgte bis zur Stufe der Phosphocellulose-Säule in Anlehnung an Ref.77 .

10 l "Brain heart infusion"-Medium, dem 2 µg NAD/ml zugesetzt waren, wurden mit 500 ml einer Überraschkultur von H.parainfluenzae angeimpft und unter starker Belüftung in einem Fermenter bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 1x10⁹/ml angezogen. Die Ausbeute betrug 25 g Zellen/Fermenter (Feuchtwicht). 100 g Zellen wurden in 390 ml Puffer A (10 mM Kaliumphosphat, pH 7,6, 1 mM Dithiothreit) suspendiert und die Zellen in Intervallen von 1 Min. für 30 Sek. beschallt, bis die Absorption bei 510 nm noch 1/10 des Ausgangswertes betrug. Aus dem Überstand der anschließenden Zentrifugation (Spinco Rotor T142,

^a Die Abkürzungen der Restriktionsnukleasen entsprechen den Vorschlägen in Ref.96 (vgl. Abkürzungsverzeichnis).

30 000 Upm, 45 min., 4°C) wurde die DNA mit 1% Streptomycinsulfat (10% in H₂O w/v, frisch bereitet) ausgefällt. Der Überstand der niedertourigen Zentrifugation (Sorvall, GS3-Rotor, 6 000 Upm, 15 min., 4°C) wurde mit Ammoniumsulfat gefällt (30-70%), der Niederschlag in 230 ml Puffer A gelöst und das Ammoniumsulfat durch Chromatographie in Puffer A auf einer Sephadex G 25-Säule (coarse, 4x100 cm) entfernt. Die salzfreien Fraktionen (310 ml in Puffer A) wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (50x2 cm, äquilibriert mit Puffer A) aufgezogen. Beide Restriktionsenzyme erschienen im Durchlauf der Säule. DNA wurde mit Puffer A, dem 1 M KCl zugesetzt war, eluiert. Die aktiven Fraktionen (220 ml) wurden auf eine Phosphocellulose-Säule (2x53 cm, Whatman P11, äquilibriert mit Puffer A) aufgezogen, die Säule mit 200 ml Puffer A gewaschen und die Restriktionsenzyme mit einem linearen Gradienten (2x 1000 ml, 0-0,8 M KCl in Puffer A) eluiert. 90% des bei 280 nm absorbierenden Materials erschien ohne nachweisbare Restriktionsaktivität zu besitzen im Durchlauf der Säule. Im Gegensatz zu Ref. 77 konnten in 11 Aufarbeitungen die beiden Aktivitäten (HpaI und HpaII) auf der Phosphocellulose-Säule nicht voneinander getrennt werden. Sie eluierten zwischen 0,2 M und 0,45 M KCl und waren mit einer unspezifischen Nuklease verunreinigt, die bei Langzeitinkubation (> 12 Std.) zu einem Verschmieren der Bänder auf dem Gel führte. Deshalb wurden die aktiven Fraktionen (550 ml) durch Druckdialyse (Amicon, UM 10-Filter) 100-fach konzentriert, auf eine Sephadex G 200-Säule (fine, 1x150 cm) aufgetragen und mit Puffer A eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 15 ml/Std. HpaI und HpaII fanden sich sowohl im Durchlauf der Säule als auch bei 1,4 Säulenvolumen. Davon abgetrennt eluierte die unspezifische Nuklease bei 0,9 Säulenvolumen. Alle Fraktionen, die Restriktionsnuklease-Aktivität zeigten (55 ml), wurden auf eine Hydroxyapatit-Säule (1,5 x 22 cm, hergestellt nach Ref.71) aufgezogen und die Enzyme mit einem linearen Gradienten (2x400 ml, 0-0,3 M Kaliumphosphat, pH 7,6, in Puffer A) eluiert. HpaII erschien bei 0,05 M Phosphat (Fraktion I), HpaI bei 0,15 M Phosphat (Fraktion II). Fraktion I enthielt nur noch wenig HpaI und Fraktion II nur noch wenig HpaII. Die jeweils unerwünschte der beiden Restriktionsaktivitäten in den Fraktionen I und II wurde entfernt, indem beide Fraktionen gegen Puffer B (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,2 mM EDTA und 14 mM 2-Mercaptoäthanol; Ref.78) dialysiert wurden und getrennt auf zwei Sephadex G 100-Säulen (90x2 cm) aufgetragen wurden. Zur Vermeidung von Aggregation wurde dem Puffer B 1 M NaCl zugesetzt. Die aktiven Fraktionen enthielten jeweils nur noch eine Restriktionsaktivität und waren frei von jeder nachweisbaren unspezifischen Nuklease. HpaI und HpaII wurden gegen Puffer B, der 50% Glycerin (v/v) enthielt, dialysiert und dabei um den Faktor 2-3 konzentriert. Die Glycerinhaltigen Fraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt. Während HpaI unter diesen Bedingungen nur 3 Monate aktiv war, konnte HpaII

für mehr als 3 Jahre ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Die Aktivität beider Enzyme wurde mit λ -DNA, PM2-DNA, ϕ 29-DNA und T7-DNA (alle von R.E. Streeck) getestet. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die für HpaI und HpaII charakteristischen Bandenmuster der erwähnten DNA's nicht bekannt. Die Identifizierung von HpaI und HpaII erfolgte durch den Vergleich der Endmuster. Als HpaI wurde dasjenige Enzym bezeichnet, das T7-DNA in 18 Fragmente spaltete, als HpaII jenes, das T7-DNA in > 40 Fragmente spaltete. SV40-DNA mit bekanntem Spaltmuster (77) stand als Testsubstrat nicht zur Verfügung. Später durchgeführte Spaltungen mit λ dv-DNA bestätigten die richtige Zuordnung der Restriktionsaktivität zu HpaI und HpaII (Ref.79).

Inzwischen wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt, das es ermöglicht, HpaI und HpaII mit Hilfe einer Heparin-Sepharose-Säule und einer DEAE-Cellulose-Säule in großen Mengen rein darzustellen (Ref.80), sodaß die beschriebene Reinigungsprozedur keine Anwendung mehr finden wird.

4.8.2 Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen

Die folgenden Restriktionsnukleasen wurden von Mitarbeitern des Instituts zur Verfügung gestellt (die Referenzen verweisen auf die Reinigungsprozedur): HaeII und HaeIII (81), sowie BamHI und SalI (Ähnlich Ref.81, außer daß der DEAE-Reinigungsschritt im Falle von BamHI und die Phosphocellulose-Säule im Falle von SalI ausgelassen wurden) von U.J. Hänggi; AluI (82), BglI und BglII (83), HhaI (84), HindII und HindIII (85), PstI und Sau3A (86) von R.E. Streeck; EcoRII (87), Bsu (88) und XbaI (Fraktionen der Bio Gel A 0,5 m-Säule) von W. Hörz; EcoRI (89) von T. Igo-Kemenes.

2-10 μ g Plasmid-DNA wurden in einem Endvolumen von 25-100 μ l gespalten, wobei der Spaltpuffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$ und 5 mM 2-Mercaptoäthanol enthielt. Für Spaltungen mit EcoRI und PstI wurden 50 mM NaCl, für SalI 75 mM NaCl, für Bsu und XbaI 100 mM NaCl zum Puffer zugesetzt. Spaltungen mit EcoRII wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$ und 5 mM 2-Mercaptoäthanol ausgeführt, Spaltungen mit Sau3A in 6 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM $MgCl_2$ und 6 mM 2-Mercaptoäthanol, Spaltungen mit HpaI in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 80 mM NaCl und 14 mM 2-Mercaptoäthanol, Spaltungen mit HpaII in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 6 mM KCl und 1 mM Dithiothreitol.

Zur Spaltung von 1 μ g DNA wurde eine Einheit Restriktionsnuklease, wie sie in Ref.86 definiert ist, eingesetzt. Die Proben

wurden von 30 Min. bis 14 Std. gespalten. Die Temperatur betrug 37°C. PstI wurde bei 30°C inkubiert.

Für die präparative Isolierung von Restriktionsfragmenten wurden 3 mg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 10 ml gespalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 2,5 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5 Volumen Äthanol gestoppt und die DNA bei -80°C (30 Min.) oder bei -20°C (14 Std.) ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren der Proben (Eppendorf-Tischzentrifuge, 6 Min.; Christ-Laborzentrifuge, 20 Min. 6 000 Upm, -15°C) wurde die DNA im Niederschlag in 1/5 des Inkubationsvolumens gelöst. Die Lösung enthielt 20% Saccharose (w/v), 2 mM EDTA und 0.001% Bromphenolblau (w/v). Nach Spaltung der DNA mit HpaI und HpaII (4.8.1) wurden die Proben mit EDTA versetzt (Endkonzentration 10 mM), lyophilisiert und die DNA in 25 µl H₂O und 10 µl "Stopper" (40% Saccharose (w/v), 0,003% Bromphenolblau (w/v), 7 M Harnstoff) gelöst und auf Acrylamid-Harnstoffgele aufgetragen (4.9.).

4.9. Gelelektrophorese

4.9.1. Analytische Trennung von Restriktionsfragmenten

Zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten wurden Agarose-Plattengele (14x24x0,25 cm) oder Rundgele (0,7x12 cm) verwendet (Abweichungen von den angegebenen Maßen, siehe Bildlegenden). Abhängig von der Größe der Restriktionsfragmente variierte die Agarosekonzentration von 0,5 bis 2%. Die Elektrophorese erfolgte für 150-270 Min. bei 3-6 V/cm in Tris-EDTA-Phosphat-Puffer (36 mM Tris - 30 mM NaH₂PO₄, pH 7,7, 1 mM EDTA; Puffer 1, Ref.90). Fragmente die kleiner als 200 bp waren, wurden auf 6% Acrylamidgelen (Acrylamid:Bisacrylamid = 20:1) in Tris-EDTA-Borat-Puffer (89 mM Tris - 89 mM Borsäure, pH 8,3, 2,5 mM EDTA; Ref.91) aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 20 Min. mit 1 µg Äthidiumbromid/ml gefärbt und wie in Ref.92 angegeben photographiert und die Negative densitometriert.

Nach der Spaltung der DNA mit HpaI und HpaII (4.8.1.) wurden die Harnstoff-haltigen Proben (4.8.2.) auf 4% Acrylamidgele (Acrylamid:Bisacrylamid = 20:1) mit aufgesetztem 3% Sammelgel (Acrylamid:Bisacrylamid = 40:1) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden für 15-20 Std. bei 2 V/cm (wie in Ref.85) aufgetrennt und mit Toluidinblau angefärbt.

4.9.2. Präparative Isolierung von Restriktionsfragmenten

Je 100 µg gespaltene Plasmid-DNA wurden auf Agarose-Rundgele (18x2,5 cm) aufgetragen und die Fragmente für 14 Std. bei 2 V/cm in Tris-EDTA-Phosphat-Puffer (4.9.1.) in Gegenwart von 1 µg Äthidiumbromid/ml aufgetrennt (4.9.1.). Die bei 360 nm fluoreszierenden Gelbereiche wurden ausgeschnitten (0,5x2,5 cm) und auf ein zweites Rundgel aufpolymerisiert. Nach dem Erstarren wurden die Gelscheiben mit 3 ml Hydroxyapatit (71) überschichtet. Die DNA wurde mit umgekehrter Polarität aus den Gelscheiben herauselektrophoretisiert, bis das Hydroxyapatit stark fluoreszierte (ca. 3 Std.). Das Hydroxyapatit wurde in eine Säule (5x2 cm) übertragen und die DNA wie in 4.4.1. eluiert. Im Gegensatz zu 4.4.1. enthielt der Puffer 2 M KCl. Die Ausbeute an isolierten Fragmenten betrug 35-55%.

Wenn weniger als 50 µg DNA zur Verfügung standen, wurden die Fragmente nach Ref.93 isoliert.

4.9.3. Bestimmung der Fragmentlängen

Die Länge der Restriktionsfragmente wurde durch Co-Elektrophorese mit DNA-Fragmenten bekannter Länge bestimmt. Fragmente mit einer Länge von mehr als 3 000 bp wurden durch Vergleich mit λ dv21-DNA und Kalbsthymus-SatellitenI-DNA (beide partiell mit EcoRI gespalten) bestimmt. Fragmente mit Längen von 50 -2 000 bp wurden durch Vergleich mit λ dv1- und PM2-DNA (beide mit Bsu gespalten) bestimmt. Die Kettenlänge der als Standard benutzten Restriktionsfragmente wurde von R.E. Streeck bestimmt (Ref.86), der auch die Referenz-DNA's zur Verfügung stellte.

In ersten Versuchen wurde Maus-Satelliten-DNA (partiell gespalten mit Eco RII) als Standard benutzt (von W. Hörz).

4.10. Ligierung der DNA

2,5-10 µg gespaltene DNA wurde in 250 µl Puffer (70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,2 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,08 mM ATP, 0,15 mg/ml Rinderserumalbumin) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 Einheiten (Ref.94) T4-induzierter Ligase (E.C.6.5.11) gestartet. Das Enzym wurde von H. Graf nach Ref.95 isoliert und zur Verfügung gestellt. Nach 12-14 Std. bei 4°C wurde die DNA in dem Ligasegemisch erneut mit Äthanol gefällt und der Niederschlag in 110 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 30 mM CaCl₂ gelöst. 100 µl wurden eingesetzt, um Zel-

len zu transformieren (4.7.); 10 μ l wurden auf 0,5% Agarosegelen elektrophoretisiert, um die Ligasereaktion zu überprüfen (Auftauchen von multimeren Banden).

4.11. in vitro Konstruktion der Plasmide

pWZ11 (7 100 bp): 25 μ g R388*-DNA wurden mit EcoRII so gespalten, daß die Hälfte bis zwei Drittel aller vorhandenen EcoRII Spaltstellen gespalten wurden. 5 μ g der gespaltenen DNA wurden ligiert und anschließend kompetente Zellen von P.mirabilis mit diesem Gemisch transformiert. Die Transformanten wurden auf Tp, Su⁻, Tra⁻ geprüft. Die DNA von drei Gruppen zu je 10 Transformanten wurde isoliert und auf 0,5% Agarosegelen aufgetrennt. Die kleinste DNA wurde isoliert und damit P.mirabilis-Zellen erneut transformiert.

pWZ61 (18 600 bp): Eine Mischung von je 4 μ g pWZ11-DNA und pSF2124-DNA wurde mit EcoRI gespalten und ligiert. Mit dem Fragmentgemisch wurde E.coli C transformiert. Die Transformanten wurden auf Tp, Ap, IceI und Cei⁻ geprüft.

pWZ74 (12 850 bp), pWZ94 (13 500 bp): 5 μ g pWZ61-DNA wurden mit BamHI gespalten und ligiert. Mit dem Fragmentgemisch wurde E.coli C transformiert. Die Transformanten wurden auf Tp, Ap, IceI⁻ (pWZ74) oder auf Tp, Ap, IceI (pWZ94) geprüft.

pWZ651 (15 000 bp): Da das 1 770 bp Fragment je ein EcoRI und ein BamHI Ende besitzt (2.2.8), mußte es, um in die EcoRI-Spaltstelle von pSF2124 eingebaut werden zu können, zuvor dimerisiert werden. 10 μ g des isolierten 1 770 bp Fragmentes wurden in Gegenwart von EcoRI für 14 Std. bei Zimmertemperatur ligiert (Gesamtvolumen 500 μ l). 5 μ g dieser DNA wurden mit 2 μ g pSF2124-DNA (zuvor mit EcoRI gespalten) ligiert und E.coli mit dem Fragmentgemisch transformiert. Die Transformanten wurden wie für pWZ61 beschrieben selektioniert.

pWZ703 (3 200 bp): 10 μ g pWZ74-DNA wurden mit BamHI und HindIII gespalten, die Spaltstücke ligiert, das entstehende Fragmentgemisch mit EcoRI gespalten und mit 2 μ g pSF2124-DNA (zuvor mit EcoRI gespalten) erneut ligiert (vgl. Schema in Abb.12). Nach Transformation von E.coli C wurden die Transformanten auf Tp, Ap⁻, IceI⁻ geprüft.

pWZ820 (5 350 bp): 10 μ g des isolierten 1 770 bp-Fragmentes wurden mit 6 μ g pBR322-DNA, die zuvor mit EcoRI und BamHI gespalten worden war, in einem Gesamtvolumen von 170 μ l li-

giert ($0,4$ Einheiten Ligase). Kompetente Zellen von *E.coli* C wurden mit $5\text{ }\mu\text{g}$ der ligierten DNA transformiert und die Transformanten auf Tp, Ap und Tc^r geprüft (Austausch des EcoRI/BamHI Fragmentes von pBR322 durch das $1\text{ }770\text{ bp}$ Fragment aus R388).

pWZ830 (6 000 bp): pWZ651-DNA wurde mit EcoRI gespalten und das verkürzte Dimer von $3\text{ }000\text{ bp}$ aus dem Gel isoliert. $2,5\text{ }\mu\text{g}$ dieses Fragmentes wurden mit $2,5\text{ }\mu\text{g}$ pAC105-DNA (mit EcoRI gespalten) ligiert. Mit dem Fragmentgemisch wurde *E.coli* P678-54 transformiert und die Transformanten auf Tp, CeI^r und IceI geprüft.

4.12. Anreicherung der Plasmid-codierten Dihydrofolatreduktase

E.coli C (pWZ82Q) wurde in $4,5\text{ l}$ L-Medium bis zu einer Zelldichte von $5 \times 10^8\text{ ml}^{-1}$ gezüchtet und die Zellen (19 gr.) in 20 ml TME-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH $8,5$, 10 mM 2-Mercaptoäthanol und 1 mM EDTA) suspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgebrochen ($4,8.1.$) und für 45 Min. bei 0°C zentrifugiert (Spinco Rotor Ti42, $33\text{ }000\text{ Upm.}$). Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat gefällt ($40\text{--}70\%$), der Niederschlag in 30 ml TME-Puffer gelöst und auf eine Sephadex G 75-Säule ($3,5 \times 45\text{ cm}$, Äquibriert mit TME-Puffer) aufgetragen. Das Fraktionsvolumen betrug 5 ml . Die Fraktionen, die die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase enthielten (Fraktion 37-48) wurden analog Ref.48 auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen ($2,5 \times 16\text{ cm}$) und das Enzym mit einem linearen Gradienten ($100+100\text{ ml}$ TME-Puffer, $0\text{--}0,5\text{ M}$ NaCl) eluiert. Das Fraktionsvolumen betrug 3 ml . Die aktiven Fraktionen (Fraktion 26-34) wurden vereinigt, 5 Min. im kochenden Wasserbad inkubiert und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (Christ-Laborzentrifuge, $6\text{ }000\text{ Upm.}$, 10 Min. , Zimmertemperatur). Der Überstand wurde auf die gleiche DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen und wie die erste Säule eluiert. Die aktiven Fraktionen (28-33) wurden vereinigt und lyophilisiert. Die spezifische Aktivität erhöhte sich von 16 mE/mg Protein nach der G 75-Säule auf ungefähr 150 mE/mg Protein nach der zweiten DEAE-Säule. Die Proteinkonzentration wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt (Ref.97).

Die Aktivität der Dihydrofolatreduktase wurde in einem Gesamtvolumen von $250\text{ }\mu\text{l}$ bei 30°C in einem Gilford Spektrophotometer nach Ref. 1 bestimmt. Die Aktivität des Plasmid-codierten Enzyms wurde in Gegenwart von $1\text{ }\mu\text{M}$ Trimethoprim bestimmt.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Um die Regulation der Synthese der Plasmid-induzierten, Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase zu untersuchen, wurde durch Anwendung der Techniken zur Neukombination von genetischem Material das Dihydrofolatreduktase-Gen und vermutlich die zur Genexpression nötigen Regulationssequenzen des R-Faktors 388 identifiziert, isoliert und charakterisiert. Die einzelnen Teilschritte dieser Untersuchung sind in Abb. 18a und 18b zusammengestellt.

Große Mengen an R388-DNA konnten isoliert werden, nachdem der R-Faktor R388 von E.coli in P.mirabilis übertragen und die Plasmid-DNA aufgrund des unterschiedlichen G+C-Gehaltes durch CsCl-Actinomycin D-Gradienten von der Wirts-DNA abgetrennt wurde. Die so isolierte R388-DNA wurde mit der Restriktionsnuklease EcoRII partiell gespalten und die entstehenden Fragmente ligiert. Mit diesem Fragmentgemisch wurden kompetente Zellen transformiert. Durch die Selektion auf Trimethoprim-Resistenz bei gleichzeitigem Verlust der Resistenz gegen Sulfonamide und der Fähigkeit, sich selbst zu übertragen, gelang es, Plasmide zu isolieren, bei denen Teile der R388-DNA deletiert waren. Die DNA des

kleinsten, sich autonom replizierenden Plasmids (pWZ11), das Trimethoprim-resistent war, hatte nur noch eine Länge von 7 100 bp (R388: 31 000 bp). Aus der Tatsache, daß in vergleichbaren Kulturen die Ausbeute an pWZ11-DNA nur ein Viertel der Ausbeute an R388-DNA betrug, wurde geschlossen, daß die Kopienzahl von pWZ11 und R388 gleich geblieben war (1-2 Kopien/Zelle).

Durch Einbau von pWZ11 in die EcoRI-Spaltstelle des ColEI-Derivates pSF2124 wurde in vitro ein Plasmid (pWZ61) konstruiert, das sich wie der Vektor in Gegenwart von Chloramphenicol amplifizieren läßt. Damit standen ausreichende Mengen DNA zur Verfügung, um eine detaillierte Restriktionskarte von pWZ61 und damit auch der eingebauten R388-Sequenzen zu erstellen. Die physikalische Karte von pWZ61 (Abb.10) zeigt die Lage von 37 Spaltstellen von 6 verschiedenen Restriktionsnukleasen.

Zur gezielten Deletion weiterer R388-Sequenzen wurde pWZ61 mit der Restriktionsnuklease BamH1 gespalten und die drei entstehenden Fragmente in vitro verknüpft. Die Transformation von kompetenten Zellen mit dem Fragmentgemisch und die Selektion der Transformanten auf Trimethoprim-haltigen Medien führten zur Isolierung der zwei Deletionsplasmide pWZ74 und pWZ94. Die Restriktionsanalyse dieser Plasmide zeigte, daß beiden nur noch ein EcoRI/BamH1-Fragment von R388 mit einer Länge von 1 770 bp gemeinsam war. Dieses Restriktionsfragment war nach Insertion in

andere Vektoren (pSF2124, pBR322, pAC105) in der Lage, die Resistenz gegen Trimethoprim auszulösen. Das bedeutet, daß auf dem 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragment das Gen für die Synthese der Trimethoprim-resistenten Dihydrofolatreduktase liegt.

Der Einbau eines Kopf-Kopf-Dimeren in das 1 770 bp-Fragment in einen Vektor (pSF2124) führte zu Deletionen im Dimer, ein möglicherweise allgemein interessantes Phänomen bei Klonierungsarbeiten. In einem Plasmid (pWZ703) war ein Monomer von 1 770 bp vollständig und von dem zweiten Monomeren die 530 bp, die dem BamHI-Ende benachbart sind, deletiert. Das bedeutet, daß von dem 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragment die 1 240 bp, die dem EcoRI-Ende benachbart sind, ausreichen, um nach Insertion in Vektoren die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase zu exprimieren. Das Enzym wurde angereichert und zeigte die bemerkenswerte Eigenschaft, für 20 Min. bei 100°C stabil zu sein. Die Aktivität ging auch nach Behandlung des Enzyms mit 6 M Harnstoff oder 2% SDS und anschließender Dialyse nicht verloren.

Der direkte Nachweis, daß auf dem 1 770 bp-Fragment das Strukturgen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase liegt, gelang weder durch Mutagenese von R388 und der Isolierung von Plasmid-Mutanten mit einer temperatursensitiven Dihydrofolatreduktase, noch durch die Synthese des Enzyms in einem DNA-abhängigen in vitro Transkriptionssystem noch durch die in vivo Syn-

these der Dihydrofolatreduktase in isolierten Minizellen. Der Nachweis des Strukturgens auf dem 1 770 bp-Fragment gelang jedoch durch den Vergleich der Menge an Trimethoprim-resistenter Dihydrofolatreduktase und der Anzahl der Plasmidkopien pro Zelle. Die Enzymmenge und die Zahl der Plasmidkopien pro Zelle waren in Zellen mit pWZ820 um den Faktor 25 gesteigert gegenüber Zellen mit dem Ausgangsplasmid R388.

Die Restriktionsanalyse der verschiedenen rekombinanten Plasmide (vgl. Abb.18a und 18b) zeigte, daß die dem 1 770 bp EcoRI/BamHI-Fragment benachbarten Sequenzen in den einzelnen Plasmiden verschieden waren. Daraus kann geschlossen werden, daß das 1 770 bp-Fragment nicht nur das Strukturgen für die Trimethoprim-resistente Dihydrofolatreduktase von R388 enthält, sondern auch mit hoher Wahrscheinlichkeit den dazugehörigen Promotor. Damit ist dieses Fragment ein geeignetes Modell, um die Regulation des Dihydrofolatreduktase-Gens zu untersuchen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 M.J. Osborn und F.M. Huennekens, J. Biol. Chem. 233, 969 - 974 (1958)
- 2 J.J. Burchall und G.H. Hitchings, Molec. Pharma. 1, 126 - 136 (1965)
- 3 F.W. Goldstein, Bulletin de L'Institut Pasteur 75, 109 - 139 (1977)
- 4 R. Ferome, J.J. Burchall und G.H. Hitchings, Molec. Pharma. 5, 49-59 (1969)
- 5 J.C.S. Perrin, A.M. Maurer und T.D. Sterling, Pediatrics 31, 833 - 839 (1963)
- 6 C.D. Bennett, Nature (London) 248, 67 - 68 (1974)
- 7 D. Stone und A.W. Phillips, FEBS Lett. 74, 85 - 87 (1977)
- 8 D.A. Matthews, R.A. Alden, J.T. Bolin, S.T. Freer, R. Hamlin, N. Xuong, J. Kraut, M. Poe, M. Williams und K. Hoogsteen, Science 197, 452 - 455 (1977)
- 9 J.R. Johnson und D.H. Hall, Virology 53, 413 - 426 (1973)
- 10 A.S. Breeze, P. Sims und K.A. Stacey, Genet. Res. 25, 207 - 214 (1975)
- 11 J.W. Littlefield, S.E. Chang, U.J. Hänggi, H. Nakamura und S.H. Orkin, Adv. Enzyme Regul. 15, 301 - 317 (1977)
- 12 Recombinant Molecules: Impact on Science and Society. Tenth Miles International Symposium (R.F. Beers und E.G. Bassett, Hrsg.), Raven Press, New York (1977)
- 13 Molecular Cloning of Recombinant DNA. Miami Winter Symposium, Bd. 13 (W.A. Scott und R. Werner, Hrsg.), Academic Press, Inc., New York (1977)
- 14 H.P. Vosberg, Human Genetics 40, im Druck (1978)

- 15 J. Collins, Current Topics in Microb. and Immun. 78, 121-170 (1977)
- 16 S.G.B. Aymes und J.T. Smith, Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 412-418 (1974)
- 17 P.M. Bennett und M.H. Richmond, J. Bact. 126, 1-6 (1976)
- 18 N. Datta und R.W. Hedges, J. Gen. Microbiol. 72, 349-355 (1972)
- 19 B. Hirt, J. Mol. Biol. 26, 365-369 (1967)
- 20 R.C. Clowes, Bact. Rev. 36, 361-405 (1972)
- 21 P. Guerry, D.J. LeBlanc und S. Falkow, J. Bact. 116, 1064-1066 (1973)
- 22 R. Thompson, S.G. Hughes und P. Broda, Molec. Gen. Genet. 133, 141-149 (1974)
- 23 T. Tanaka und B. Weisblum, J. Bact. 121, 354-362 (1975)
- 24 D.B. Clewell und D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62, 1159-1166 (1969)
- 25 G.O. Humphreys, G.A. Willshaw und E.S. Anderson, Biochim. Biophys. Acta 383, 457-463 (1975)
- 26 M. Birnstiel, J. Telford, E. Weinberg und D. Stafford, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2900-2904 (1974)
- 27 R.E. Streeck und G. Hobom, Eur. J. Biochem. 57, 595-606 (1975)
- 28 M. So, R. Gill und S. Falkow, Molec. Gen. Genet. 142, 239-249 (1975)
- 29 V. Hershfield, H.W. Boyer, C. Yanofsky, M.A. Lovett und D. R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3455-3459 (1974)
- 30 M.A. Lovett, D.G. Guiney und D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3854-3857 (1974)
- 31 D.B. Clewell, J. Bact. 110, 667-676 (1972)
- 32 A. Oka und M. Takanami, Nature (London) 264, 193-196 (1976)

- 33 F. Heffron, P. Bedinger, J.J. Champoux und S. Falkow, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 702-706 (1977)
- 34 G. Dougan, M. Saul, G. Warren und D. Sherratt, Molec. Gen. Genet. 158, 325-327 (1978)
- 35 R.J. Roberts, G.A. Wilson und F.E. Young, Nature (London) 265, 82-84 (1977)
- 36 R.B. Meagher, R.C. Tait, M. Betlach und H.W. Boyer, Cell 10, 521-536 (1977)
- 37 F. Bolivar, R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker und H.W. Boyer, Gene 2, 95-113 (1977)
- 38 R. Sheldon und S. Brenner, Molec. Gen. Genet. 147, 91-97 (1976)
- 39 S. Falkow, Infective Multiple Drug Resistance. (J.R. Lagnado Hrsg.), Pion Limited, 207 Brondesbury Park, London (1975)
- 40 R.B. Trimble, J. Galivan und F. Maley, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1659-1663 (1972)
- 41 A.C. Frazer und R. Curtiss III, Current Topics in Microb. and Immun. 69, 1-84 (1975)
- 42 S.B. Levy, J. Bact. 120, 1451-1463 (1974)
- 43 H. Avni, P.E. Berg und A. Markovitz, J. Bact. 129, 358-366 (1977)
- 44 S.B. Levy, J. Bact. 103, 836-839 (1970)
- 45 A.J. Kool, M.S. van Zeben und H.J.J. Nijkamp, J. Bact. 118, 213-224 (1974)
- 46 U.K. Laemmli, Nature (London) 227, 680-685 (1970)
- 47 W.M. Bonner und R.A. Laskey, Eur. J. Biochem. 46, 83-88 (1974)
- 48 S.G.B. Amyes und J.T. Smith, Eur. J. Biochem. 61, 597-603 (1976)
- 49 U.J. Hägggi und J.W. Littlefield, J. Biol. Chem. 249, 1390-1397 (1974)
- 50 K.H. Pattishall, J. Acar, J.J. Burchall, F.W. Goldstein und R.J. Harvey, J. Biol. Chem. 252, 2319-2323 (1977)

- 51 G.P. Mell, M. Martelli, J. Kirchner und F.M. Huennekens, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 74-79 (1968)
- 52 Y.M. Kupfersztuch-Portnoy, G.L.G. Miklos und D.R. Helinski, J. Bact. 120, 545-548 (1974)
- 53 R. Rownd und S. Mickel, Nature New Biol. 234, 40-43 (1971)
- 54 S. Hu, E. Ohtsubo, N. Davidson und H. Saedler, J. Bact. 122, 764-775 (1975)
- 55 K. Ptashne und S.N. Cohen, J. Bact. 122, 776-781 (1975)
- 56 P.T. Barth, N. Datta, R.W. Hedges und N.J. Grinter, J. Bact. 125, 800-810 (1976)
- 57 J.A. Shapiro und P. Sporn, J. Bact. 129, 1632-1635 (1977)
- 58 D. Bastia, Nucleic Acids Res. 4, 3123-3142 (1977)
- 59 J. Collins und B. Hohn, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., im Druck (1978)
- 60 J. Inselburg und P. Ware, J. Bact. 132, 321-331 (1977)
- 61 J. Inselburg, J. Bact. 132, 332-340 (1977)
- 62 K. Timmis, F. Cabello und S.N. Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4556-4560 (1974)
- 63 J. Foulds und C. Barrett, J. Bact. 116, 885-892 (1973)
- 64 R.L. Blakley, Nature (London) 188, 231-232 (1960)
- 65 J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1972)
- 66 S.D. Cosloy und M. Oishi, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 84-87 (1973)
- 67 H.I. Adler, W.D. Fischer, A. Cohen und A.A. Hardigree, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 321-326 (1967)
- 68 H.R. Herschman und D.R. Helinski, J. Biol. Chem. 242, 5360-5368 (1967)
- 69 R.P. Novick, R.C. Clowes, S.N. Cohen, R. Curtiss III, N. Datta und S. Falkow, Bact. Rev. 40, 168-189 (1976)

- 70 A. Worcel und E. Burgi, J. Mol. Biol. 71, 127-147 (1972)
- 71 G. Bernardi, in: Procedures in Nucleic Acid Research, (G.L. Cantoni und D.R. Davis, Hrsg.) 70, 455-499, Harper und Row, New York (1971)
- 72 J.A. Meyers, D. Sanchez, L.P. Elwell und S. Falkow, J. Bact. 127, 1529-1537 (1976)
- 73 H.J. Vogel und D.M. Bonner, J. Biol. Chem. 218, 97-106 (1956)
- 74 M. Bazaral und D.R. Helinski, J. Mol. Biol. 36, 185-194 (1968)
- 75 P.T. Barth und N.J. Grinter, J. Bact. 120, 618-630 (1974)
- 76 E.M. Lederberg und S.N. Cohen, J. Bact. 119, 1072-1074 (1974)
- 77 P.A. Sharp, B. Sugden und J. Sambrook, Biochemistry 12, 3055-3063 (1973)
- 78 F.M. DeFilippes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 586-596 (1974)
- 79 B. Allet, R.J. Roberts, R.F. Gesteland und R. Solem, Nature (London) 249, 217-221 (1974)
- 80 T.A. Bickle, V. Pirrotta und R. Imber, Nucleic Acids Res. 4, 2561-2572 (1977)
- 81 R.J. Roberts, J.B. Breitmeyer, N.F. Tabachnik und P.A. Myers, J. Mol. Biol. 91, 121-123 (1975)
- 82 R.J. Roberts, P.A. Myers, A. Morrison und K. Murray, J. Mol. Biol. 102, 157-165 (1976)
- 83 V. Pirrotta, Nucleic Acids Res. 3, 1747-1760 (1976)
- 84 R.J. Roberts, P.A. Myers, A. Morrison und K. Murray, J. Mol. Biol. 103, 199-208 (1976)
- 85 P. Philippsen, R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 45, 479-488 (1974)
- 86 R.E. Streeck und H.G. Zachau, zur Veröffentlichung eingereicht (1978)

- 87 R.N. Yoshimori, Dissertation. Univ. von Calif., San Francisco (1971)
- 88 K. Heininger, W. Hörz und H.G. Zachau, *Gene* 1, 291-303 (1977)
- 89 P.J. Greene, M.C. Betlach, H.W. Boyer und H.M. Goodman, in: *Methods Mol. Biol.*, (R.B. Wickner, Hrsg.) 7, 87-111, M. Dekker, New York (1974)
- 90 U.E. Loening, *Biochem. J.* 113, 131-138 (1969)
- 91 A.C. Peacock und C.W. Dingman, *Biochemistry* 6, 1818-1827 (1967)
- 92 W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, *Nature (London)* 258, 450-452 (1975)
- 93 R.W.J. Thuring, J.P.M. Sanders und P. Borst, *Analyt. Biochem.* 66, 213-220 (1975)
- 94 B. Weiss, A. Jacquemin-Sablon, T.R. Live und G.C. Fareed, *J. Biol. Chem.* 243, 4543-4555 (1968)
- 95 K.W. Knopf, *Eur. J. Biochem.* 73, 33-38 (1977)
- 96 H.O. Smith und D. Nathans, *J. Mol. Biol.* 81, 419-423 (1973)
- 97 O. Warburg und W. Christian, *Biochem. Z.* 310, 384-421 (1942)

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die Abkürzungen der Plasmid-Marker folgen den Vorschlägen in Ref.69 , die Restriktionsnukleasen sind wie in Ref.96 abgekürzt.

A,T,G,C,	Desoxyribonukleotide
A ₂₆₀ (280,510,580)	Extinktion bei 260 (280,510,580) nm und 1 cm Schichtdicke
AluI	Restriktionsnuklease aus <u>Arthrobacter luteus</u> ATCC 21606
Ap	Resistenz gegen Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat, Na-Salz
bp	Basenpaare
BglI (II)	Restriktionsnuklease I (II) aus <u>Bacillus globigii</u>
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
Bsu	Restriktionsnuklease aus <u>Bacillus subtilis</u> , Stamm X5
Ce1	Produktion von Colicin E1
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EcoRI	Restriktionsnuklease aus <u>Escheria coli</u> RY13
EcoRII	Restriktionsnuklease aus <u>Escheria coli</u> R245

EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
G+C-Gehalt	Anteil an Guanin und Cytosin in der Gesamt-DNA
HaeII (III)	Restriktionsnuklease II (III) aus <u>Haemophilus aegyptius</u> ATCC 11116
HhaI	Restriktionsnuklease aus <u>Haemophilus haemolyticus</u> ATCC 10014
HindII (III)	Restriktionsnuklease II (III) aus <u>Haemophilus influenzae</u> R _d
HpaI (II)	Restriktionsnuklease I (II) aus <u>Haemophilus parainfluenzae</u>
Ice1	Immunität gegen Colicin E1
λ(Ø29,PM2,T7)-DNA	Desoxyribonukleinsäure der Bakteriophagen Lambda (Ø29,PM2,T7)
Min.	Minute(n)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, reduziert
PstI	Restriktionsnuklease aus <u>Providencia stuartii</u> 164
RNA	Ribonukleinsäure
SalI	Restriktionsnuklease aus <u>Streptomyces albus</u> G
Sau3A	Restriktionsnuklease aus <u>Staphylococcus aureus</u> 3A
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
Std.	Stunde(n)
Su	Resistenz gegen Sulfonamide
SV40	Simian-Virus 40
Tc	Resistenz gegen Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer

TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer
TEP	Tris-EDTA-Phosphat-Puffer
TES	Tris-EDTA-Salz-Puffer
TME	Tris-Mercaptoäthanol-EDTA-Puffer
Tp	Resistenz gegen Trimethoprim
Tra	Fähigkeit der Plasmide, sich selbst zu übertragen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
XbaI	Restriktionsnuklease aus <u>Xanthomonas</u> <u>badrii</u> ATCC 11672

LEBENS LAUF

Am 18. Februar 1946 wurde ich als drittes von vier Kindern des Elektroingenieurs Martin Zolg und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Höfle, in Worms-Abenheim geboren. Von 1952 bis 1956 besuchte ich die dortige Volksschule und anschließend das Staatl. Gauß-Gymnasium in Worms/Rh. Nach der Mittleren Reife wechselte ich 1962 in die "Besonderen Oberstufenklassen" des Staatl. Max-Planck-Gymnasiums in Ludwigshafen/Rh, wo ich 1966 die Abschlußprüfung ablegte, die zum Studium an einer Pädagogischen Hochschule des Landes Rheinland-Pfalz berechnigte. 1967 legte ich im Ministerium für Unterricht und Kultus in Mainz die Ergänzungsprüfung ab, die zur Erlangung der vollen Hochschulreife vorgeschrieben war. Ab 1968 studierte ich an der Technischen Hochschule Darmstadt Biologie, Hauptfach Mikrobiologie. Das Studium beendete ich 1973 mit dem Hauptdiplom-Examen. Die Diplomarbeit mit dem Thema "Physiologische Untersuchungen zur Taxonomie einer unbekannten Pseudomonas-Art" wurde im Fachbereich Biologie unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. J.C.G. Ottow angefertigt.

Seit Oktober 1973 arbeite ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. H.G. Zachau an der vorliegenden Dissertation.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
verwendet zu haben.

München, den 15. Mai 1978

